



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**OPTIMALIZACE POSTUPU IZOLACE A
CHARAKTERIZACE AMORFNÍCH PHB GRANULÍ**

OPTIMISATION OF ISOLATION PROCEDURE AND CHARACTERIZATION OF
AMORPHOUS PHB GRANULES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Zdeněk Kratochvíl

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Michal Kalina, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP0981/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Bc. Zdeněk Kratochvíl**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Michal Kalina, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Optimalizace postupu izolace a charakterizace amorfních PHB granulí

Zadání diplomové práce:

- 1) Optimalizovat postup izolace a stabilizace syntetických amorfních PHB granulí
- 2) Nalézt vhodné metody pro základní charakterizaci připravených PHB granulí
- 3) Postupy optimalizované pro syntetické PHB granule využít pro izolaci a stabilizaci nativních PHB z buněk
- 4) Zaměřit se na metody stanovení a ovlivnění stupně krystalinity PHB
- 5) Závěrečné shrnutí získaných výsledků a diskuze

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Zdeněk Kratochvíl
student(ka)

Ing. Michal Kalina, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

V rámci této práce byly nejprve připraveny umělé PHB granule. Pomocí dynamického a elektroforetického rozptylu světla byl studován vliv použitého rozpouštědla PHB, vliv teploty a délky působení ultrazvukové lázně, vliv teploty odpaření rozpouštědla a vliv povahy stabilizačních látek. Nejvhodnější parametry byly pozorovány u granulí připravených rozpouštěním PHB v chloroformu, stabilizací CTAB nebo lecitinem, ultrasonifikací při 35 °C a následným odpařováním chloroformu při 60 °C. Na základě výsledků ATR-FTIR a Ramanovy spektroskopie bylo zjištěno, že PHB v umělých granulích byl krystalický. Nativní PHB granule byly izolovány z bakterií *Cupriavidus necator* pomocí lysozymu, deoxyribonukleázy a rozrušením buněk ultrazvukem nebo digescí buněk s alkalázou, SDS a EDTA. Granule získané oběma izolačními postupy byly charakterizovány pomocí ATR-FTIR, Ramanovy spektroskopie, technikami rozptylu světla a DSC. Výsledky analýz ukázaly, že druhý zmíněný postup je pro získání polymeru v amorfním stavu mnohem efektivnější. Polymer uvnitř granulí izolovaných tímto způsobem byl navíc i tepelně stabilnější. Nakonec byly vzorky nativních PHB granulí vystaveny vlivu acetonu, lipázy a chlornanu sodného s tím, že by tyto látky měly v různé míře zvýšit krystalinitu polymeru. Nejvyšší krystalinita PHB bylo dosaženo po jejich ošetření lipázou.

ABSTRACT

First artificial PHB granules were prepared under the terms of this thesis. The effect of used PHB solvent, ultrasonic bath temperature and time, solvent evaporation temperature and stabilizing agent nature was investigated using dynamic and electrophoretic light scattering. The most proper parameters were demonstrated at samples which were prepared by dissolving of PHB in chloroform, stabilizing with CTAB or lecithin, ultrasonifying at 35 °C followed by chloroform evaporating at 60 °C. Based on ATR-FTIR and Raman spectroscopy results, it was found out that PHB within the artificial granules were in crystalline form. The native PHB granules were isolated from *Cupriavidus necator* using either lysosyme, deoxyribonuclease and cell disruption by ultrasonification or digestion with alcalase, SDS and EDTA. Granules obtained by both isolation procedures were characterized by ATR-FTIR, Raman spectroscopy, light scattering techniques and DSC. According to the analyses results, the second mentioned procedure turned out to be more effective for obtaining the polymer in amorphous state. Furthermore, the polymer within granules recovered by using this procedure was thermally more stable. Last but not least, the native PHB granules samples were exposed to effect of acetone, lipase and sodium hypochlorite, assuming that polymer crystallinity should be increased by these chemicals in varying degrees. The highest degree of crystallinity was achieved after their treatment with lipase.

KLÍČOVÁ SLOVA

polyhydroxybutyrát, PHB granule, *Cupriavidus necator*, krystalinita, Ramanova spektroskopie, infračervená spektroskopie, diferenční kompenzační kalorimetrie, rozptyl světla

KEY WORDS

polyhydroxybutyrate, PHB granules, *Cupriavidus necator*, crystallinity, Raman spectroscopy, infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry, light scattering

KRATOCHVÍL, Z. *Optimalizace postupu izolace a charakterizace amorfních PHB granulí*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 75 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Michal Kalina, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych tímto poděkoval vedoucímu mé diplomové práce Ing. Michalu Kalinovi, Ph.D. a konzultantovi Ing. Petru Sedláčkovi, Ph.D. za jejich odborné rady, vstřícný přístup, ochotu a spolupráci. Velký dík patří i Ing. Evě Slaninové za pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za jejich podporu.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	POLY-3-HYDROXYBUTYRÁT	9
2.1.1	Produkce PHB	9
2.1.2	PHB granule	11
2.1.3	Vlastnosti PHB	13
2.1.4	Metody izolace PHB	14
2.1.5	Využití PHB	15
2.2	METODY CHARAKTERIZACE PHB GRANULÍ	16
2.2.1	Ramanova spektroskopie	16
2.2.2	Rentgenová difraktometrie	19
2.2.3	Metody založené na rozptylu světla	21
2.2.4	Rastrovací elektronová mikroskopie	23
2.2.5	Diferenční kompenzační kalorimetrie	24
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	25
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
4.1	MATERIÁLY	28
4.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE	29
4.3	PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE ARTIFICIÁLNÍCH PHB GRANULÍ	29
4.3.1	Optimalizace rozpouštění krystalického PHB	29
4.3.2	Studium vlivu teploty a délky působení ultrazvukové lázně	30
4.3.3	Optimalizace postupu odpaření rozpouštědla	30
4.3.4	Studium vlivu povahy stabilizačních látek	30
4.3.5	Charakterizace artificiálních lecitinových PHB granulí ostatními metodami	31
4.4	IZOLACE A CHARAKTERIZACE NATIVNÍCH PHB GRANULÍ	31
4.4.1	Izolace nativních PHB granulí pomocí lysozymu, deoxyribonukleázy a mechanického rozrušení buněk ultrazvukem	31
4.4.2	Izolace nativních PHB granulí pomocí alkalázy a SDS	32
4.4.3	Charakterizace nativních PHB granulí	32
4.5	ÚPRAVA NATIVNÍCH PHB GRANULÍ A JEJICH CHARAKTERIZACE	32
4.5.1	Úprava nativních PHB granulí acetonem	33

4.5.2	Úprava nativních PHB granulí chlornanem sodným	32
4.5.3	Úprava nativních PHB granulí lipázou	33
4.5.4	Charakterizace upravených nativních PHB granulí	33
5	VÝSLEDKY A DISKUSE	34
5.1	PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE ARTIFICIÁLNÍCH PHB GRANULÍ	34
5.1.1	Optimalizace rozpouštění krystalického PHB	34
5.1.2	Studium vlivu teploty a délky působení ultrazvukové lázně	35
5.1.3	Optimalizace postupu odpaření rozpouštědla	37
5.1.4	Studium vlivu povahy stabilizačních látek	39
5.1.5	Charakterizace artificiálních lecitinových PHB granulí	40
5.2	CHARAKTERIZACE NATIVNÍCH PHB GRANULÍ	44
5.2.1	Infračervená spektroskopie	44
5.2.2	Ramanova spektroskopie	47
5.2.3	Rozptyl světla.....	48
5.2.4	Teplotně modulovaná diferenční kompenzační kalorimetrie.....	49
5.3	CHARAKTERIZACE UPRAVENÝCH NATIVNÍCH PHB GRANULÍ	50
5.3.1	Infračervená spektroskopie	50
5.3.2	Rozptyl světla.....	55
6	ZÁVĚR	58
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	60
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	66
8.1	SEZNAM ZKRATEK.....	66
8.2	SEZNAM SYMBOLŮ.....	66
9	PŘÍLOHY	68

1 ÚVOD

V posledních letech stále více rostou tendence vývoje materiálů, které by plnohodnotně nahrazovaly funkci a využití konvenčních plastů a zároveň by byly šetrné k životnímu prostředí. Jednou z možností je produkce bioplastů, tj. polymerních materiálů vyznačujících se svou biodegradabilitou. Řadí se mezi ně např. polymery kyseliny mléčné, polymery odvozené od škrobu nebo polyhydroxyalkanoáty. Většina z nich je navíc syntetizována z obnovitelných zdrojů nebo odpadních substrátů pomocí mikroorganismů.

K nejvýznamnějším bioplastům patří bezpochyby polyhydroxyalkanoáty, zejména pak polyhydroxybutyrát. Za počátek zkoumání tohoto polymeru se dá považovat první polovina dvacátého století, kdy byl poprvé izolován z bakteriálních buněk. V průběhu následujících desetiletí byly provedeny rozsáhlé studie zabývající se podmínkami a úpravou jeho produkce, formou ukládání uvnitř mikroorganismů a možnostmi izolace. Kromě toho byla studována také struktura tohoto polymeru, jeho vlastnosti a využití, které zatím bohužel není zdaleka tak velké, jak by se dalo předpokládat. Z části je to zapříčiněno tím, že po izolaci z mikroorganismů polyhydroxybutyrát více či méně krystalizuje. Tím jsou zhoršeny jeho vlastnosti, což činí tento polymer hůře zpracovatelným. Proto je důležité nalézt vhodnou metodu jeho izolace, která by zajistila získání tohoto polymeru v nativním amorfním stavu, a zároveň také způsob, jak zabránit jeho spontánní krystalizaci.

Pro studium krystalinity polyhydroxybutyrátu uvnitř granulí se nabízí hned několik analytických metod. Ze spektrálních technik lze využít např. infračervenou a Ramanovu spektroskopii, UV-VIS spektrometrii nebo rentgenovou difraktometrii. Z přímých zobrazovacích technik se uplatňují především elektronová mikroskopie a mikroskopie atomárních sil. Seriózní výsledky poskytují i metody termické analýzy.

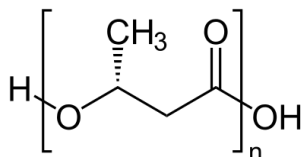
Cílem práce je nejprve připravit a charakterizovat umělé PHB granule. Výsledky z této části experimentu by mohly být využity pro další studium přípravy mikročástic, popř. nanočástic na bázi tohoto polymeru jako nosičů léčiv a jiných bioaktivních látek. Hlavní úkol spočívá v nalezení vhodné metody izolace PHB granulí z bakteriálních buněk, po níž by polymer uvnitř granulí zůstal v co nejvíce amorfní formě, a následném stanovení krystalinity tohoto polymeru pomocí vhodných a dostupných analytických metod. V neposlední řadě je zde nutné prostudovat i různé vlivy, které ovlivňují krystalinitu PHB uvnitř izolovaných granulí a způsobují jeho přechod z amorfní na krystalickou formu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Poly-3-hydroxybutyrát

Poly-3-hydroxybutyrát se řadí mezi nejvýznamnější biopolymery ze skupiny polyhydroxyalkanátů. PHA jsou polyestery příslušné hydroxyalkanové kyseliny, které mohou být produkovány mnoha druhy bakterií jako zásoba energie. Tyto polymery mají schopnost rychlé biodegradace [1].

Hlavní monomerní jednotkou poly-(*R*)-3-hydroxybutyrátu je (*R*)-3-hydroxybutanová kyselina. Základní struktura je znázorněna na Obr. 1.



Obr. 1: Schéma struktury P3HB

2.1.1 Produkce PHB

K biotechnologické produkci PHB jsou využívány především bakterie. Některé druhy (*Alcaligenes latus*, rekombinantní *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii*) produkují PHB při dostatku esenciálních živin během svého růstu. Existují však i bakterie, u kterých probíhá biosyntéza PHB pouze v případě nedostatku zdrojů esenciálních prvků (např. dusíku, fosforu, síry, hořčíku) a současného nadbytku zdroje uhlíku. Příkladem takových bakterií může být *Cupriavidus necator*, *Protomonas extorquens* nebo *Bacillus subtilis* [2, 3].

PHB je rovněž syntetizován mikroorganismy domény *Archea*. Jedná se konkrétně o rody z čeledi *Halobacteriaceae*, které akumulují tento polymer při dostatečném množství zdroje uhlíku a zároveň nedostatečném množství zdrojů jiných esenciálních prvků [4].

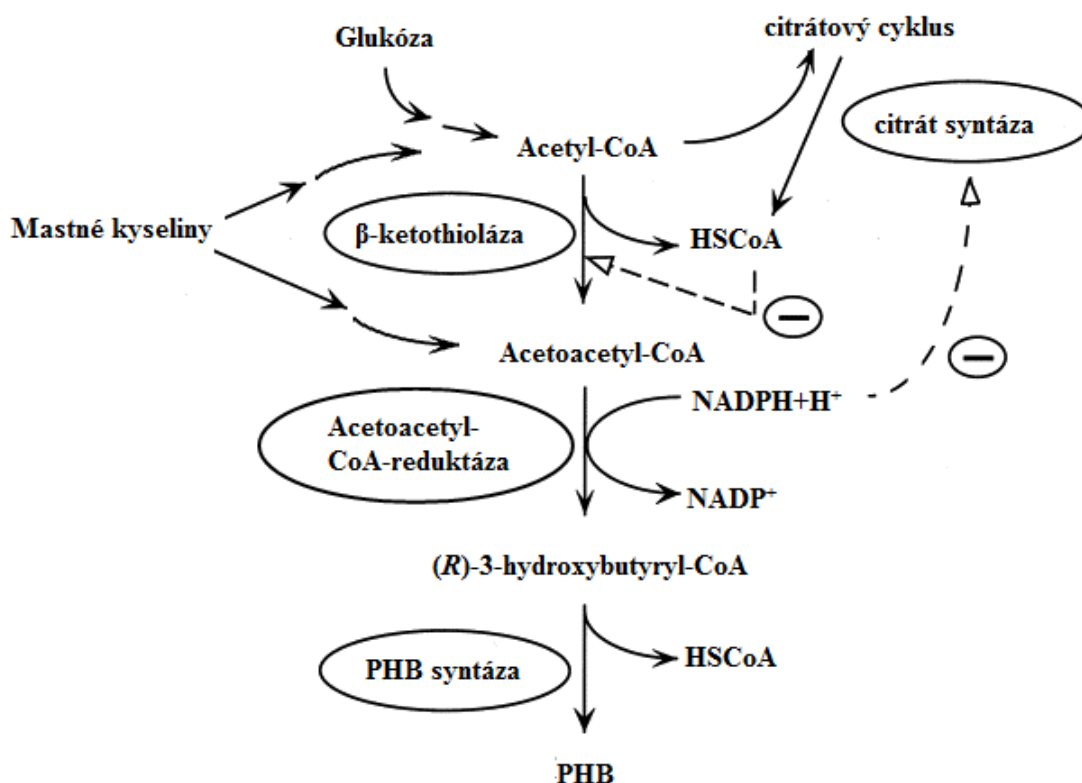
Mezi potenciální, avšak ne příliš efektivní eukaryotní producenty PHB lze řadit i některé kvasinky (transgenní *Schizosaccharomyces pombe*) [5] nebo transgenní rostliny (např. řepka olejka) [6].

Jak již bylo výše řečeno, k akumulaci PHB potřebují bakterie zdroj uhlíku. Tím mohou být jednoduché sacharidy (glukóza nebo fruktóza), disacharidy (sacharóza, laktóza) nebo polysacharidy (škrob). K biosyntéze tohoto polymeru jsou dále využívány substráty obsahující rostlinné oleje či mastné kyseliny. Jako zdroj uhlíku zužitkovávají některé druhy mikroorganismů živiny na bázi organických kyselin (kyselina mléčná, kyselina octová, kyselina propionová, kyselina pyrohroznová) a alkoholů (glycerol). Bakterie jsou ovšem schopny k produkci PHB využívat i komplexnějších zdrojů, jimiž jsou např. melasa, syrovátka, odpadní vody a odpadní fritovací oleje [7, 8]. Naopak některé z nich (např. *Cupriavidus necator*) za autotrofních podmínek jsou schopny využívat jednoduchý zdroj uhlíku, jako je oxid uhličitý. K tomu však musí být tento plyn přiváděn do bioreaktoru společně s plynným kyslíkem a vodíkem ve vhodném poměru [9].

Polyhydroxybutyrát je tvořen v cytoplazmě bakterií a může tvořit až 80 % buněčné sušiny. Hlavním prekurzorem pro syntézu tohoto polymeru je acetyl-CoA. V případě kultivace bakterií na sacharidech, glycerolu, kyselině mléčné, octové či pyrohroznové vzniká acetyl-CoA přirozenými katabolickými drahami určitého mikroorganismu za účasti příslušných

enzymů. Pokud jsou bakterie kultivovány na médiu obsahujícím mastné kyseliny nebo oleje, vzniku acetyl-CoA (popř. acetoacetyl-CoA) předchází β -oxidace mastných kyselin.

V prvním kroku syntézy PHB kondenzují dvě molekuly acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA. Tuto reakci katalyzuje enzym zvaný β -ketothioláza. Acetoacetyl-CoA je v následujícím kroku za katalýzy NADPH-dependentní acetoacetyl-CoA reduktázy stereospecificky redukován na (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA. Polymerizací molekul (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA pomocí enzymu PHB-syntázy za současného uvolnění HSCoA vzniká poly(*R*)-3-hydroxybutyrát [10]. U některých mikroorganismů může produkce PHB probíhat s určitými rozdíly. Například v cytoplasmě bakterie *Rhodospirillum rubrum* nejprve dochází ke vzniku (*S*)-3-hydroxybutyryl-CoA, který je za katalýzy dvou specifických enoyl-CoA hydratáz převeden na (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA [11]. Celá syntéza je přibližena na Obr. 2.



Obr. 2: Schéma biosyntézy PHB [2]

Celá dráha syntézy PHB je regulována koncentrací acetyl-CoA a HSCoA v buňce. V případě kultivace mikroorganismu na médiu s dostatečným množstvím všech živin je acetyl-CoA v citrátovém cyklu sloučen s oxalacetátem pomocí citrát syntázy za vzniku citrátu a uvolnění HSCoA, který inhibuje činnost β -ketothiolázy. NADH vznikající během citrátového cyklu je průběžně metabolizován. Je-li však v živném médiu nedostatek dusíku, zvýší se intracelulární koncentrace NADH (popř. NADPH) natolik, že tyto redukované koenzymy inhibují aktivitu citrát syntázy a izocitrát dehydrogenázy, tudíž nedochází k odbourání acetyl-CoA v citrátovém cyklu, ale k syntéze PHB výše popsáním mechanismem. Vysoká koncentrace NADPH navíc také aktivuje funkci NADPH-dependentní acetoacetyl-CoA reduktázy [10, 12].

2.1.2 PHB granule

Syntetizovaný PHB si bakterie ukládají ve formě granulí (inkluzí). Velikost a lokalizace těchto granulí v buňce se liší s druhem daného mikroorganismu a také s různými podmínkami kultivace, ale většinou spadá do rozpětí 200–500 nm.

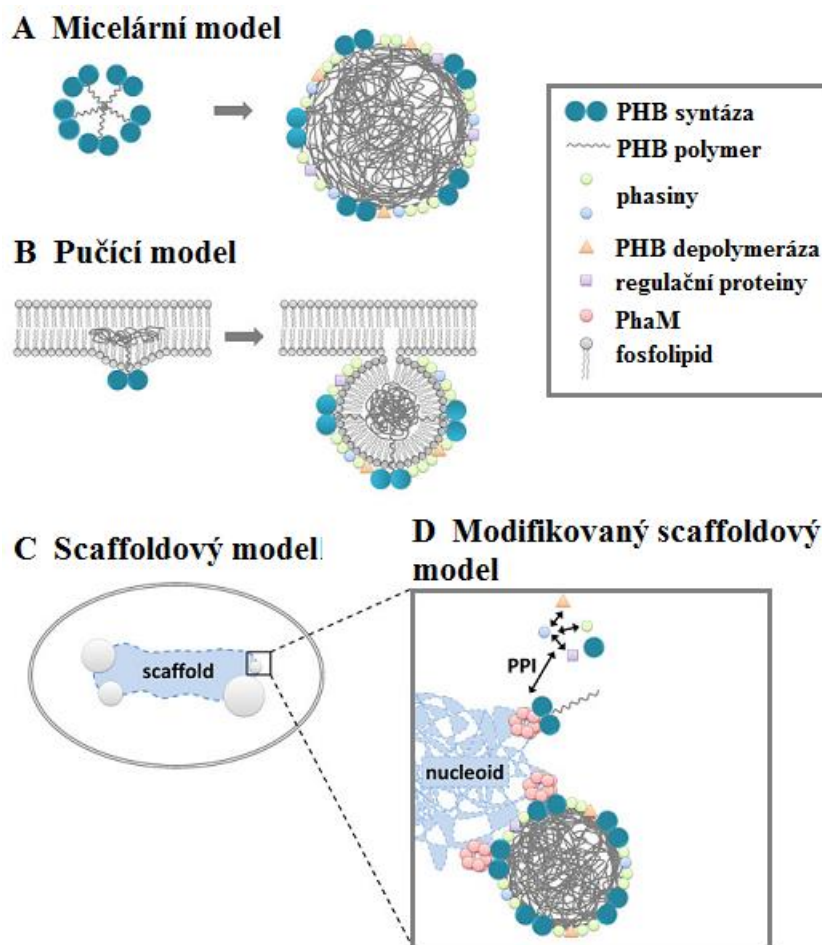
Výsledky studií z elektronové mikroskopie potvrzují, že PHB granule jsou v buňce obaleny povrchovou vrstvou odlišnou od polymerního jádra. PHB se v granulích *in vivo* vyskytuje v amorfním stavu a je náchylný k hydrolýze intracelulárními PHB depolymerázami. Ovšem jakmile jsou PHB granule vystaveny chemickému, biochemickému nebo fyzikálnímu stresu, stanou se odolnými vůči působení PHB depolymeráz a v polymerním řetězci začnou převažovat krystalické části [13].

Zpočátku se předpokládalo, že PHB granule jsou obklopeny lipidovou vrstvou, do níž jsou zabudovány proteiny. Toto tvrzení ale bylo založeno pouze na složení izolovaných PHB granulí, které obsahovaly zhruba 97,7 % PHB, 1,9 % proteinů a minimální množství lipidů (zejména fosfatidové kyseliny). Zatím neexistují přímé důkazy přítomnosti fosfolipidů v povrchové vrstvě PHB granulí *in vivo* [13]. Nedávná studie však s využitím interakce fluorescenčně značených fúzních proteinů s proteinem, který se specificky váže na fosfolipidy, potvrdila *in vivo* přítomnost fosfolipidů pouze v cytoplazmatické membráně, nikoliv v povrchové vrstvě PHB granulí. Přítomnost fosfolipidů *in vitro* v povrchové vrstvě PHB granulí může být zapříčiněna jejich izolací z buněk. Fragmenty rozrušené cytoplazmatické membrány se na ně totiž pravděpodobně díky hydrofobním interakcím navážou [20].

S jistotou lze naopak říci, že na povrchu PHB granulí je přítomno několik specifických proteinů zodpovědných za syntézu a degradaci PHB a tvorbu granulí. PHB syntáza je klíčovým enzymem katalyzující polymerizaci (*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA. PHB depolymeráza je zodpovědná za degradaci amorfního PHB v granulích po vyčerpání zdroje energie z kultivačního média. Phasiny jsou nejvíce zastoupenými proteiny v povrchové vrstvě granulí. Nekatalyzují žádnou metabolickou reakci, ale fungují jako strukturní materiál. Jsou tvořeny hydrofobní částí orientovanou do středu granulí a hydrofilní částí orientovanou do cytoplazmy. Vrstva phasinů granule stabilizuje, zabraňuje jejich slučování a vazbě jiných proteinů nesouvisejících s metabolismem PHB na jejich povrch. Kromě toho má množství phasinů vliv i na velikost a počet PHB granulí v buňce. Regulační proteiny exprese phasinů (PhaR) se za normálních podmínek kultivace vážou na sekvenci DNA, která zahajuje transkripci genu pro tvorbu phasinů. Tím dojde k inhibici tohoto procesu a tvorba phasinů je tak potlačena. Jakmile začne probíhat syntéza PHB, proteiny PhaR se pomocí hydrofobních interakcí ireverzibilně vážou na povrch granulí. Snížením jejich koncentrace v cytoplazmě je znovuobnovena transkripce genů pro syntézu phasinů. K opětovné interakci PhaR proteinů s příslušnou částí genu pro tvorbu phasinů dochází tehdy, je-li povrch granulí zcela pokryt těmito proteiny a PhaR proteiny nenachází další volné místo k navázání, tudíž jeho koncentrace v cytoplazmě vzroste. Kromě toho se PhaR proteiny vážou i na promotor svého vlastního genu. Jedná se o autoregulační represi, která zajišťuje tvorbu pouze nezbytně nutného množství PhaR proteinů potřebných k inhibici transkripce genu pro syntézu phasinů [19].

Kromě výše uvedených komponent je v jádru PHB granulí obsaženo i malé množství vody (5–10 %), která zde působí jako plastifikátor [21].

Modely tvorby PHB granulí vychází z teoretických předpokladů a experimentálních dat získaných ze studií chování bakterie *C. necator* a jsou zobrazeny na Obr. 3.



Obr. 3: Modely tvorby PHB granulí [13]

Podle micelárního modelu lze usoudit, že molekuly PHB syntázy začínají produkovat hydrofobní molekulu PHB tehdy, je-li koncentrace substrátu ((*R*)-3-hydroxybutyryl-CoA) dostatečně vysoká. Díky své hydrofobicitě a malé rozpustnosti PHB ve vodném prostředí cytoplazmy se řetězce vznikajícího polymeru systematicky uspořádávají a vytváří micelární struktury s částečně hydrofilními molekulami PHB syntázy navázanými na rostoucí konci polymeru. Posléze se na rostoucí granule připojí phasiny a ostatní výše zmíněné proteiny. Tvorba granulí je iniciována v jakémkoli místě cytoplazmy, a tudíž se mohou vyskytovat kdekoli v celém objemu buňky.

Tzv. „pučící“ model předpokládá to, že PHB syntáza je umístěna přímo uvnitř cytoplazmatické membrány, nebo je k ní pouze připojena. Rostoucí hydrofobní PHB řetězec je pak uvolňován do fosfolipidové dvojvrstvy cytoplazmatické membrány, čímž se tvoří nová PHB granule. Jakmile je granule dostatečně velká, dojde k jejímu oddělení od cytoplazmatické membrány a připojení phasinů a ostatních výše zmíněných proteinů k jejímu povrchu. Tento model je však v rozporu s výše uvedenou studií [20] popírající výskyt fosfolipidů v povrchové vrstvě granulí.

Třetí model tvorby PHB granulí je založen na existenci neznámé podpůrné molekuly, na níž je navázána PHB syntáza s narůstajícím polymerním řetězcem. Lokalizace PHB granulí

tedy závisí na povaze a umístění podpůrné molekuly. Tento model vznikl především na základě výsledků studie pomocí TEM, která potvrdila existenci tmavě zbarvených tzv. podpůrných buněčných struktur ve středu buňky, v jejíž blízkosti se PHB granule nacházely. Novější studie akumulace PHB s využitím kryotomografie potvrdila výskyt PHB granulí ve středu buňky, nicméně žádná podpůrná struktura v blízkosti granulí pozorována nebyla. Je však důležité podotknout, že na kryotomogramech nebyla viditelná oblast nukleoidu. Tato měření tedy nevylučují, že nukleoid by mohl zastávat roli oné podpůrné buněčné struktury. Kromě toho tato studie vyloučila pravděpodobnost „pučícího“ modelu, protože nedetekovala žádné granule připojené k cytoplazmatické membráně [13].

2.1.3 Vlastnosti PHB

PHB je izotaktický polymer se všemi chirálními uhlíky v molekule v *R* konfiguraci, což jej činí také semikrystalickým. K jeho krystalizaci ovšem dochází až po izolaci z buněk, kde se vyskytuje v amorfním stavu. Krystalinita PHB zpravidla dosahuje 55–80 %, což zapříčiňuje jeho křehkost, tuhost a také vysokou teplotu tání (kolem 175 °C), která je velmi blízká teplotě rozkladu na kyselinu krotonovou (kolem 185 °C). Nízký rozdíl těchto dvou teplot výrazně znesnadňuje zpracovatelnost tohoto polymeru. Tento problém lze vyřešit inkorporací bloků PHA obsahujících jinou monomerní jednotku (např. 3-hydroxyvalerát). Takto vzniklé kopolymery pak mají kromě snazší zpracovatelnosti i přijatelnější materiálové vlastnosti [14].

Tento polymer se v některých mechanických vlastnostech podobá polypropylen. Youngův modul pružnosti v tahu PHB činí 3,5 GPa a pevnost v tahu PHB činí 43 MPa. Hodnoty délkové roztlačnosti PHB se pohybují okolo 3–8 %, což je o dva řády méně než v případě polypropylen [15]. Srovnání některých fyzikálních a materiálových vlastností u vybraných polymerů je uvedeno v Tab. 1.

Tab. 1: Fyzikální a materiálové vlastnosti některých polymerů [21]

polymer	T_m (°C)	T_g (°C)	krystalinita (%)	Youngův modul (GPa)	pevnost v tahu (MPa)	délková roztlačnost (%)
P(3HB)	175	4	70	3,5	43	3–8
P(3HB-co-10% 3HV)	162	–1	59	0,8	20	50
P(3HB-co-20% 3HV)	135	–2	58	1,2	32	50–100
PCL	65	–61	67	0,19	14	500
PP	168	–20	60	1,3	36	350

Molekulová hmotnost PHB závisí na typu producenta. Většinou se ale nachází v rozmezí $1 \cdot 10^4$ – $3 \cdot 10^6$ Da s polydisperzitou okolo 2 [15]. Dále tento polymer vykazuje dobré bariérové vlastnosti proti pronikání vlhkosti, pachů a aromat [1]. Rozpouští se v mnoha halogenovaných uhlovodících (např. v chloroformu, dichlormethanu, 2,2,2-trifluorethanolu nebo trichlorethylenu) a mnoha jiných organických rozpouštědlech (např. v propylenkarbonátu, dimethylformamidu nebo trioleinu). Částečně rozpustný je v benzenu, 1,4-dioxanu, toluenu, anilinu nebo pyridinu a nerozpustný je ve vodě, *n*-hexanu, etheru, methanolu, ethanolu, izopropanolu nebo *n*-butanolu [16].

Kromě výše popsaných vlastností PHB vyniká svou biodegradabilitou. Mikroorganismy v životním prostředí jsou schopny tento polymer rozložit pomocí PHB hydroláz a PHB depolymeráz až na oxid uhličitý a vodu (popř. methan). Rychlost degradace se může lišit s molekulovou hmotností polymeru anebo s podmínkami prostředí. Některé kmeny půdních bakterií rozkládají PHB lépe za aerobních podmínek, zatímco denitrifikační bakterie jej v přítomnosti dusičnanů dokáží rozložit při anaerobních podmínkách. Rozklad polymeru může urychlit i UV záření. V živočišných tkáních dochází ke štěpení PHB hydrolyticky a pomocí nespecifických esteráz. Rychlost degradace pak závisí na mechanických vlastnostech polymeru, jeho krystalinitě a molekulové hmotnosti [23, 48].

PHB je také vysoce biokompatibilní. Neinhibuje růst savčích buněk ani jejich životnost. Po implantaci do tkání vyvolává pouze nepatrnou zánětlivou reakci. Jednou z příčin jeho biokompatibility může být přirozený výskyt 3-hydroxybutyrátu a jeho oligomerů v tkáních jakožto meziproduktů degradace tohoto polymeru [23].

2.1.4 Metody izolace PHB

Metody založené na rozpustnosti PHB

Použití rozpouštědel pro extrakci PHB z mikrobiální biomasy je jednou z nejstarších metod a dodnes se především díky své jednoduchosti a relativní rychlosti používá. Zakládá se na dvou krocích, kdy je nejprve pomocí vhodných organických rozpouštědel (tj. chloroform, dichlormethan nebo propylenkarbonát) modifikována propustnost buněčných membrán, což umožní uvolnění a rozpuštění PHB. Následuje precipitace polymeru přidavkem methanolu či ethanolu, tzn. rozpouštědla, v němž se PHB nerozpouští.

Mimo jiné nachází tato izolační metoda také výhodu v tom, že odstraňuje bakteriální endotoxiny a dochází při ní pouze k nepatrné degradaci polymeru. Tudiž je možné izolovat PHB o vysoké čistotě a vysoké molekulové hmotnosti.

Jeden z hlavních problémů tohoto druhu izolace (který mj. spouští i kaskádu dalších obtíží s ním spojených) je výrazné narušení přirozené struktury PHB granulí, čímž dojde k uvolnění extrahovaného polymeru do okolního prostředí. Při koncentraci PHB vyšší než 5 hm.% nastávají díky vysoké viskozitě polymerního roztoku potíže s jeho izolací z nerozpuštěných buněčných zbytků. Proto je nutné použít obrovské množství rozpouštědla, což ale v případě např. halogenovaných uhlovodíků není šetrné k životnímu prostředí. Z toho důvodu se stále více jako alternativa uplatňují nehalogenovaná organická rozpouštědla. Velice oblíbeným se stal propylenkarbonát, a to především díky jeho nízké toxicitě a vyššímu bodu varu (240 °C), který umožňuje jeho opakované použití, což značně snižuje i jeho spotřebu [17, 18].

Metody založené na rozpuštění buněčných komponent

Jednu z možností pro rozrušení buněčných komponent nabízí surfaktanty, jako je např. dodecylsulfát sodný (SDS). Ten se inkorporuje do lipidové dvojvrstvy cytoplazmatické membrány. Při zvyšující se koncentraci SDS roste počet těchto molekul zabudovaných do cytoplazmatické membrány do té doby, než membrána praskne a vytvoří micely složené z membránových lipidů a molekul SDS, čímž se PHB uvolní do prostředí. SDS je mimo to schopný denaturovat proteiny a rozrušit i jiné buněčné složky. Nevýhodou použití surfaktantů při izolaci je nízký stupeň čistoty PHB.

Další možností je použití chlornanu sodného. Takto izolovaný polymer vykazuje vyšší stupeň čistoty, avšak nižší molekulovou hmotnost. Nativní amorfnní PHB granule jsou totiž vůči alkalickému prostředí náchylné. Jsou tudíž rozkládány na rozpustné monomery a oligomery. Ovšem v případě izolace z bakterií *C. necator* nebo rekombinantní *E. coli* se molekulová hmotnost PHB mění jen minimálně.

K rozrušení biomembrán a jiných buněčných komponent lze uplatnit i různé enzymy, zejména proteolytické. Tyto enzymy efektivně rozkládají proteiny obsažené v buněčných membránách a zároveň nepřispívají k degradaci PHB. Účinnost izolace a čistotu PHB lze zvýšit např. pomocí chelátů [17, 18].

Metody založené na mechanickém rozrušení buněčných komponent

Rozrušení buněk může být realizováno pomocí tzv. kuličkových mlýnů, kde dochází ke kontaktu buněk s pevnými kuličkami, které na ně působí střížnými silami.

V případě vysokotlaké homogenizace je suspenze buněk vysokotlakou pumpou protlačena dvěma úzkými štěrbinami, přičemž jsou buňky rozbity.

K odstranění nepotřebných buněčných komponent lze použít i ultrasonifikaci nebo centrifugaci kombinovanou s chemickým nebo enzymatickým zpracováním [17, 18].

2.1.5 Využití PHB

Kvůli jeho tuhosti, křehkosti a dalším ne příliš příznivým mechanickým a fyzikálním vlastnostem zatím nenachází tento polymer širší uplatnění. V praxi se využívá jeho kopolymer s hydroxyvalerátem pro výrobu různých recyklovatelných obalových materiálů (např. fólií, tašek, či obaly kosmetických a hygienických výrobků) [22].

Čistý PHB lze využít zejména v oblastech, kde není kladen důraz na jeho houževnatost, ale hlavně na jeho čistotu. Díky jeho biokompatibilitě a biodegradabilitě může nalézt své uplatnění v humánní medicíně a farmakologii. Perspektivní oblastí využití PHB je vývoj lékařských implantátů pro zubní a kožní lékařství nebo ortopedii, jako jsou např. šrouby, kostní náhrady či protézy, chirurgické nitě, síťky a textilie na bázi tohoto polymeru [23].

Biodegradabilita a biokompatibilita tohoto polymeru také umožňuje jeho aplikaci při výrobě nanočástic a mikročástic jako nosičů léčiv a jiných bioaktivních látek. Ty se dají připravit buď z izolovaného syntetizovaného polymeru s využitím organických rozpouštědel a surfaktantů, anebo enzymatickou syntézou PHB *ex situ*. V případě možnosti použití nanočástic připravených prvním způsobem při terapii je nutné si uvědomit, že by mohly obsahovat zbytky toxických organických rozpouštědel, které se nepodařilo odstranit. Díky tomu by takto připravené nosiče nebyly prakticky vůbec použitelné. Dalším problémem je pak přítomnost surfaktantů, které by mohly mít nepříznivé účinky na lidské zdraví. Tato úskalí řeší druhý uvedený způsob přípravy PHB nanočástic. Ty by obsahovaly pouze samotný polymer s enkapsulovanou bioaktivní látkou a proteiny zajišťující jejich stabilizaci, popř. interakci s daným typem buněk. Takto funkcionalizované nanočástice nebo mikročástice by mohly najít své uplatnění v teranostice. S jejich pomocí by byla nejprve lokalizována postižená tkáň a po této detekci by následně docházelo k postupnému uvolňování léčiva, které by zapříčinilo změny v metabolismu cílových buněk [49, 50].

Z PHB lze rovněž připravit scaffoldy pro osazení buňkami. Při vhodné metodě jejich přípravy mohou být využity pro tkáňové inženýrství kožních buněk [51], nervové tkáně [52] nebo buněk srdeční svaloviny [53].

2.2 Metody charakterizace PHB granulí

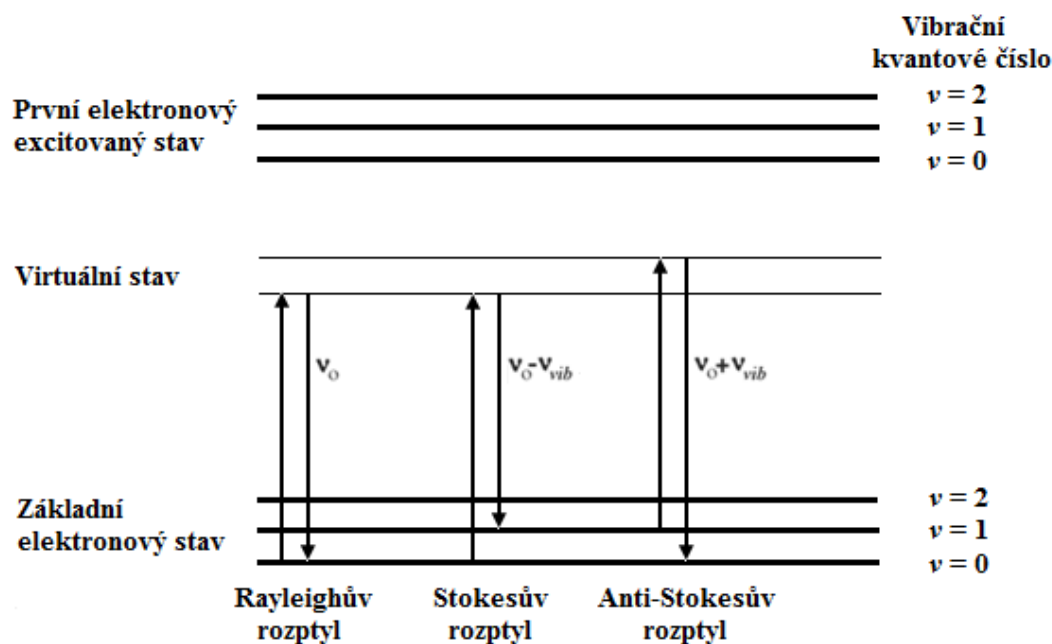
2.2.1 Ramanova spektroskopie

Tato metoda vibrační molekulové spektroskopie je pojmenována po svém objeviteli, indickém fyzikovi Chandrasekharu Venkatu Ramanovi. Lze ji využít pro kvalitativní i kvantitativní analýzu široké škály vzorků. Poskytuje podobné informace jako infračervená spektrometrie a je s touto technikou komplementární [24].

Princip

Při Ramanově spektroskopii interaguje monochromatický laserový paprsek s molekulami vzorku, čímž dojde k jejich excitaci ze základního elektronového do tzv. virtuálního energetického (nekvantovaného) stavu. Pokud nastane deexcitace do stavu, v němž se molekula nacházela před působením budicího záření, vlnová délka emitovaného záření při deexcitaci je stejná jako vlnová délka excitujícího záření. Tento jev se nazývá elastický neboli Rayleighův rozptyl záření.

Kromě něj ale dochází i k neelastickému, tzv. Ramanově rozptylu záření, který je doprovázen změnou energie záření. Při deexcitaci se totiž molekula navrácí na vyšší excitovanou vibrační hladinu základního elektronového stavu, a zároveň emituje záření s nižší energií (větší vlnovou délkou), než bylo záření budicí. Takové změny vlnové délky se v Ramanově spektru projeví jako Stokesovy linie. Může však nastat případ, kdy se molekuly před excitací nachází na vyšší vibrační hladině základního elektronového stavu (např. v důsledku tepla). Během deexcitace pak dochází k jejich návratu na základní vibrační hladinu základního elektronového stavu za současné emise záření s větší energií (menší vlnovou délkou). V Ramanově spektru se tyto změny označují jako anti-Stokesovy linie. Jsou méně intenzivní než Stokesovy linie, jelikož ve stavu excitovaném se nachází menší množství molekul než ve stavu základním [24, 25]. Jednotlivé typy přechodů molekul do různých stavů znázorňuje Obr. 4.

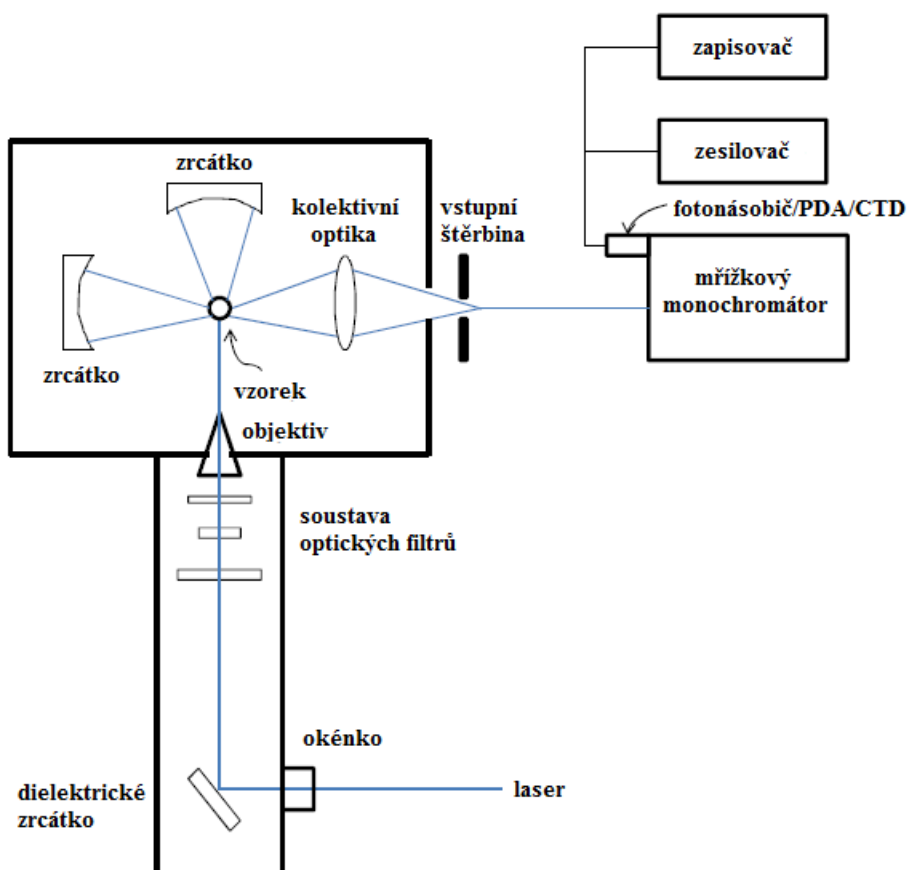


Obr. 4: Schéma přechodů mezi různými energetickými stavy molekul při excitaci v blízké infračervené oblasti

Výsledkem záznamu měření je Ramanovo spektrum, tedy závislost intenzity Ramanova rozptylu na vlnové délce záření (popř. relativním vlnočtu). Bývá zaznamenáváno zpravidla v rozmezí od 4 000 do 10 cm^{-1} . Je však důležité podotknout, že v Ramanově spektru jsou aktivní pouze takové vibrace, které vedou ke změně polarizovatelnosti molekuly, tzn. ke změně míry rozložení náboje v molekule. Nejvíce se tedy projeví pásy vibrací nepolárních částí molekul. Polohy jednotlivých pásů dávají informace o charakteru vazeb a druhu vázaných atomů v molekule. Intenzita těchto pásů poskytuje kvantitativní údaj a je úměrná koncentraci dané složky ve vzorku [24, 25].

Instrumentace

Jako zdroje monochromatického záření v Ramanových spektrometrech dnes výhradně slouží lasery. Bývají upřednostňovány lasery s větší vlnovou délkou, a to zejména zelené (Nd:YAG), červené (He-Ne) nebo lasery v blízké infračervené oblasti. Důvod je ten, že lasery s kratší vlnovou délkou (např. argonový nebo kryptonový) vytváří ve vzorku značnou fluorescenci a způsobují tak fotochemickou degradaci vzorku. Monochromatický laserový paprsek prochází okénkem do komory s optickou soustavou a je odražen dielektrickým zrcátkem. Dále míří skrz několik optických filtrů a objektiv přímo na vzorek, který je uložen ve skleněné nebo křemenné kyvetě. Záření rozptýlené (emitované) vzorkem je pomocí několika zrcátek kolem kyvety nasměrováno na kolektivní optiku, která se nachází zpravidla v pravém úhlu vůči dopadajícímu paprsku a fokusuje jej na vstupní štěrbinu. Po průchodu touto štěrbinou putuje dále do dvojitého nebo trojitého mřížkového monochromátoru. Ten společně s různými stínicími filtry odseparuje velmi intenzivní Rayleighovu složku rozptýleného záření od relativně slabé Ramanovy složky. Jako detektory mohou sloužit fotonásobiče, soustavy fotodiod nebo jiné sofistikovanější systémy využívající CTD senzory. Jejich úlohou je převod světelného signálu na elektrický [24, 26].



Obr. 5: Schéma uspořádání Ramanova spektrometru [26]

Využití

Jak již bylo výše naznačeno, Ramanova spektrometrie často jako doplňková metoda k infračervené spektrometrii nalézá své uplatnění při identifikaci struktury molekul, popř. jejich kvantifikaci ve vzorku, který může být pevný, kapalný, plynný nebo ve formě prášku či gelu [27].

Co se týče chemických a fyzikálních vlastností, oplývá tato technika schopností stanovit obsah vlhkosti vzorku, jeho celkovou morfologii, hustotu, zastoupení jednotlivých monomerních jednotek v polymeru nebo studovat kinetiku polymerace. Kromě toho je vhodná pro určení krystalinity polymerů [26]. V Ramanově spektru analyzovaných polymerů lze totiž rozeznat pásy vibrací charakteristické pro jejich amorfni a krystalické části [28].

Jelikož se jedná o nedestruktivní analytickou metodu, její využití je velmi široké. V geologii a mineralogii ji lze použít pro identifikaci hornin, nerostů a drahokamů. S její pomocí lze stanovit množství vody začleněné do struktury minerálů a pozorovat jejich chování při extrémních podmínkách. V materiálovém výzkumu je schopna sledovat čistotu nanomateriálů, uhlíkových či polovodičových součástí. Ve farmacii lze prostřednictvím Ramanovy spektrometrie pozorovat např. koncentraci a distribuci léčivých látek v tabletách, čistotu léčivých přípravků, uniformitu směsí nebo polymorfní formy prášků. V biologii pak tato metoda přispívá svým dílem při charakterizaci biomolekul a buněk, analýze struktury kostí a jiných tkání, diagnostice či studiu interakce léčiv s buňkami [27].

2.2.2 Rentgenová difraktometrie

Rentgenové záření

Rentgenové záření se v elektromagnetickém spektru nachází mezi ultrafialovým zářením a gama zářením. Vzniká při interakci urychleného svazku elektronů s atomy vhodného materiálu. Po dopadu těchto elektronů s dostatečně vysokou energií na daný atom dojde k vyražení jeho elektronů z vnitřních energetických hladin. Vytvořená vakance je obsazena přechodem elektronu z vnějších orbitalů s vyšší energií, jehož důsledkem je uvolnění kvanta záření odpovídající energetickému rozdílu mezi jednotlivými orbitaly. Ten je přesně dán kvantováním těchto hladin (orbitalů), tudíž vzniklé záření je charakteristické a má jednoznačně definovanou vlnovou délku. Dílčí přeskoky elektronů mezi jednotlivými energetickými hladinami pak vytváří čárové spektrum, které je závislé na použitém materiálu, s nímž elektrony o vysoké energii interagují.

Může však nastat situace, kdy jsou urychlené elektrony zpomaleny vlivem elektrického pole atomového jádra. Změní se tedy jejich kinetická energie, což způsobí vyzáření elektromagnetického vlnění s různými frekvencemi. Toto záření je označováno jako brzdné a vytváří spojité spektrum [29, 30].

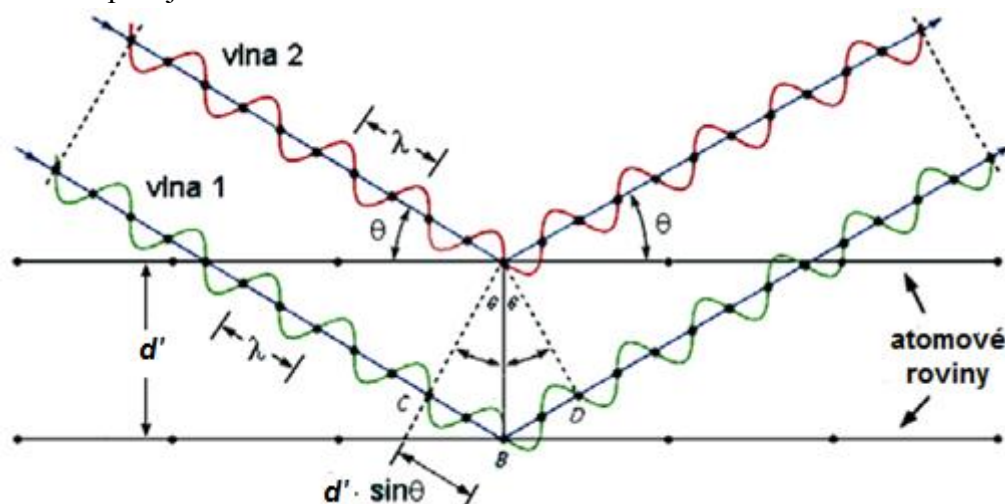
Rentgenové spektrum je tedy tvořeno dvěma složkami: spektrem brzdného záření (spojitým) a spektrem charakteristického záření (čárovým) [29].

Difrakce rentgenového záření

Při dopadu rentgenového paprsku na krystal se toto záření díky periodickému uspořádání krystalové struktury rozptýlí a následně interferuje. Tento jev se nazývá difrakce a popisuje jej Braggův zákon (1)

$$2d' \sin \theta = n\lambda, \quad (1)$$

kde d je vzdálenost mezi rovinami, θ je difrakční úhel, n představuje řád reflexe a λ vlnovou délku dopadajícího záření.



Obr. 6: Znárodnění Braggova zákona pro $n = 1$ [33]

Difrakci lze pozorovat tehdy, dochází-li ke konstruktivní interferenci rozptýleného záření, tedy k jeho zesílení. Jinými slovy se musí paprsky rozptýlené sousedními atomovými rovinami krystalu setkat ve fázi, tzn. že dráhový rozdíl jejich vln musí být roven celočísel-

němu násobku vlnové délky dopadajícího záření [29, 31]. Tento jev je schematicky znázorněn na Obr. 6.

Směry jednotlivých difrakcí jsou dány velikostí a tvarem základních stavebních částí krystalu, zatímco jejich intenzity závisí na druhu a uspořádání atomů ve struktuře krystalu [32]. Difrakční maxima se vyskytují pouze u krystalických látek, zatímco u látek amorfních se neobjevují z důvodu nepravidelně uspořádané struktury [31].

Prvky rentgenového difraktometru

Jedním z nejvýznamnějších zdrojů rentgenového záření jsou rentgenové trubice, zvané též rentgenové lampy nebo rentgenky. Žhavená katoda (zpravidla wolframové vlákno) v nich produkuje elektrony, které jsou urychleny vysokým elektrickým napětím. Po jejich dopadu na kovovou anodu (nejčastěji z mědi, železa, molybdenu nebo chromu) předají svou energii a díky výše popsanému procesu vznikne rentgenové záření charakteristické pro použitý materiál anody. Elektrony přitom dopadají na anodu fokusovaně, k čemuž slouží buď různé fokusační prvky, nebo přímo vhodně tvarovaná žhavená katoda. Při fungování rentgenové lampy vzniká obrovské množství odpadního tepla a pouze malá část dodané energie je využita k tvorbě rentgenového záření. Z toho důvodu je anoda chlazena vodou, která přebytečné teplo odvádí [30, 34].

Další možností produkce rentgenového záření jsou tzv. synchrotrony. K tvorbě synchrotronového záření dochází pohybem elektronů urychlených v elektrickém a magnetickém poli na rychlost blízkou rychlosti světla. Jejich dráha je kruhově zakřivená. Jeho hlavní výhodou je vysoká intenzita v široké části spektra, přičemž v oblasti rentgenového záření převyšuje i po monochromatizaci o dva až tři řády intenzitu nejvýkonnějších rentgenek. Jedná se ovšem o velice nákladná zařízení [29].

Za zdrojem rentgenového záření bývají obvykle umístěny optické filtry a monochromátory. Pomocí kolimátorů a zrcátek jsou monochromatické paprsky usměrněny tak, aby rovnoběžně mířily na vzorek [34]. Ten je analyzován ve formě krystalu nebo prášku. Lze však měřit i vzorky na bázi tenkých vrstev [31].

Držák vzorku a detektor, který se pohybuje po kružnici kolem něj, jsou mechanicky propojeny pomocí goniometru. Ten jimi otáčí tak, aby se pozice detektoru vůči dopadajícímu záření nacházela v dvojnásobném úhlu oproti vzorku [34]. K detekci odraženého záření lze použít plynový proporcionální detektor, založený na ionizaci plynu (argonu) v trubici odraženým zářením, přičemž volné elektrony, popř. výsledné napětí odpovídají energii tohoto záření. Scintilační detektory obsahují scintilační krystal, v němž se po dopadu rentgenového paprsku excitují elektrony, které při deexcitaci emitují viditelné záření dopadající na citlivou fotokatodu. Z ní se pak uvolní elektrony a jsou nasměrovány na dynody fotonásobiče. K detekci v rentgenové difraktometrii mohou sloužit i polovodičové nebo pozičně citlivé detektory [35]. Získané signály jsou vždy posléze zpracovány příslušnou elektronikou, převedeny do počítače a zobrazeny nejčastěji v podobě píků [34].

Využití

Metoda XRD je vhodná pro identifikaci neznámých krystalických materiálů. Toho lze využít při studiu polymerů za účelem zjištění jejich mechanických vlastností, termostability, opacity, polymorfismu nebo velikosti a orientace jejich řetězců. S její pomocí lze také

sledovat fázové přechody. V okamžiku fázového přechodu se díky novému uspořádání atomů a molekul objeví nové difrakční píky, zatímco ty staré zaniknou. Pokud tedy při fázovém přechodu například vznikne nová krystalická fáze, může být původní série difrakčních píků v difraktogramu nahrazena jinou.

Rentgenová difrakce je klíčovým nástrojem pro geologický výzkum. Každý minerál je totiž definován svou charakteristickou krystalovou strukturou, jíž odpovídá určitý rentgenový difrakční obrazec (popř. pík). To umožňuje identifikovat podíl různých minerálních látek obsažených v horninách a půdách.

XRD rovněž hraje významnou roli ve všech fázích vývoje nových léčiv včetně jejich testování a výroby. Je nedílnou součástí analytického výzkumu, vývoje a řízení kvality aktivních farmaceutických substancí i pomocných látek. Menší rozdíly ve výsledcích analýzy v průběhu jejich vývoje mohou způsobit problémy při výrobě konečné lékové formy a ovlivňovat tak účinnost, biologickou dostupnost a stabilitu léčiv.

Kromě výše uvedených aplikací nalézá rentgenová difraktometrie uplatnění v nanotechnologiích a materiálových vědách (např. při studiu nanokrystalů, grafenu, uhlíkových nanotrubic nebo kovových materiálů), mikroelektronice, sklářském průmyslu nebo forenzní analýze [54, 55].

2.2.3 Metody založené na rozptylu světla

Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla (DLS) je optická metoda založená na sledování fluktuací intenzity rozptýleného světla částicemi, které se pohybují ve vzorku na základě Brownova pohybu. Díky neustálým změnám polohy částic vůči detektoru se mění i frekvence rozptýleného světla. Na základě této fluktuace intenzity rozptýleného světla je možné stanovit difuzní koeficient a z něj posléze i hydrodynamický poloměr částic. Ten lze definovat jako poloměr koule určené částicí (popř. molekulou), která rotuje ve všech směrech, a její hydratační vrstvou. Vzájemný vztah těchto veličin je popsán Stokes-Einsteinovou rovnicí (2)

$$r_h = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot D}, \quad (2)$$

kde k_B je Boltzmannova konstanta, T je termodynamická teplota, η je viskozita rozpouštědla a D je difuzní koeficient. [36].

Pro analýzu velikosti či distribuce velikosti částic lze využít přístroj Zetasizer Nano ZS. Laserový paprsek procházející kyvetou umístěnou uvnitř přístroje, je rozptýlen částicemi zkoumaného vzorku a následně zachycen detektorem. Ve formě signálu je rozptýlené světlo převedeno do digitálního korelátoru, jenž porovnává podobnost dvou signálů za určitou časovou prodlevu. Po velmi krátkém časovém úseku se intenzity těchto signálů téměř neliší (korelace se blíží 1). Po delší době se ale shoda mezi jednotlivými signály začne zmenšovat a korelace postupně bude klesat k nule. Příčinou tohoto jevu je Brownův pohyb částic [37].

Elektroforetický rozptyl světla

Tato metoda umožňuje stanovit elektrokinetický (zeta) potenciál s využitím pohyblivosti částic ve vzorku vlivem vloženého elektrického pole. Zeta potenciál je obecně mírou náboje roviny skluzu v difúzní části elektrické dvojvrstvy nabitě koloidní částice a určuje stabi-

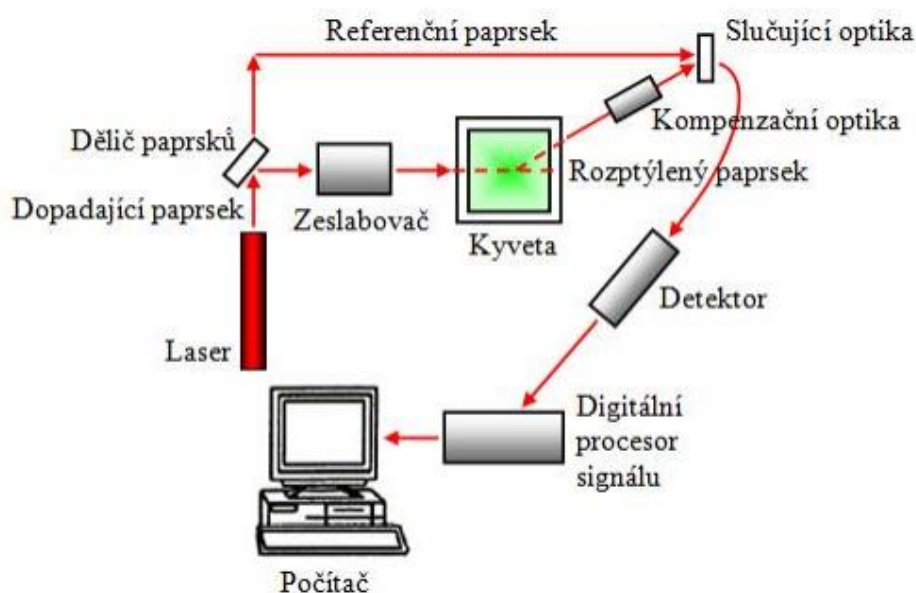
litu koloidních systémů. Stabilní koloidní systém se vyznačuje odolností vůči působení různých typů sil a jeho částice mají vysokou zápornou nebo kladnou hodnotu zeta potenciálu. V případě nestabilních koloidních systémů dochází k maximálnímu snížení volné energie na fázovém rozhraní a částice tudíž inklinují k agregaci, koagulaci či sedimentaci. Zeta potenciál částic takového systému má nízkou absolutní hodnotu zeta potenciálu (blíží se nule). Mezi těmito rozdílnými stavy je pro studium stability koloidních systémů určena hranice zeta potenciálů o hodnotě ± 30 mV [38, 39].

Zeta potenciál je s využitím přístroje Zetasizer Nano ZS měřen opticky pomocí laserového paprsku. Ten je veden ze zdroje do děliče, kde je rozložen na dva paprsky dělicí optikou. Každý z nich putuje jiným směrem, jeden jako referenční paprsek a druhý jako paprsek směřující ke kyvetě se vzorkem. Zeslabovač nacházející se před kyvetou snižuje intenzitu záření paprsku za účelem zmírnit riziko přetížení detektoru. Po interakci paprsku se vzorkem dojde na částicích k jeho rozptýlení. Intenzita rozptýleného záření bude díky částicím pohybujícím se vlivem elektrického pole fluktuovat. Frekvence této fluktuace je úměrná rychlosti částic. Referenční a rozptýlený laserový paprsek jsou dále směřovány skrz slučující optickou soustavu na místo detektoru, jehož úlohu v tomto případě zastávají fotodiody nebo fotonásobiče. Informace o světelném paprsku je převedena až do počítače, kde je na základě Dopplerova frekvenčního posunu vypočítána elektroforetická pohyblivost a zeta potenciál [37]. Vzájemný vztah těchto veličin je dán Henryho rovnicí (3)

$$v = \frac{2 \cdot D_e \cdot \zeta \cdot U}{3 \cdot \eta \cdot l}, \quad (3)$$

kde D_e je dielektrická konstanta, ζ je elektrokinetický potenciál a η je viskozita prostředí.

Podíl $\frac{U}{l}$ představuje intenzitu elektrického pole (tedy napětí vložené na kyvetu o dané délce) [38].



Obr. 7: Schematické znázornění přístroje Zetasizer Nano ZS při měření zeta potenciálu [37]

2.2.4 Rastrovací elektronová mikroskopie

Rastrovací (někdy též označována jako skenovací) elektronová mikroskopie využívá při analýze vzorku svazek urychlených elektronů. Pohybující se elektron má podle de Broglieho charakter vlny o vlnové délce

$$\lambda = \frac{h}{m_e \cdot v_e} \quad (4)$$

a frekvenci

$$f = \frac{E}{h}, \quad (5)$$

kde h je Planckova konstanta, m_e je hmotnost pohyblivého se elektronu, v jeho rychlost a E jeho energie, pro niž platí vztah

$$E = \frac{1}{2} m_e \cdot v_e^2 = e \cdot U, \quad (6)$$

kde U je urychlovací napětí. Kombinací vztahů (4) a (6) lze odvodit závislost vlnové délky na urychlovacím napětí

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2e \cdot m_e \cdot U}}. \quad (7)$$

Změnou urychlovacího napětí je tedy možné měnit i vlnovou délku svazku elektronů. A protože lze tímto dosáhnout i velmi malých hodnot vlnových délek, poskytuje elektronový mikroskop mnohem větší rozlišení než mikroskop světelný [40].

Urychlené elektrony v SEM mají vysokou kinetickou energii, která se při jejich dopadu na pevný vzorek rozptýlí ve formě různých signálů. Tyto signály zahrnují sekundární elektrony, zpětně odražené elektrony, difraktované zpětně odražené elektrony, fotony charakteristického rentgenového záření, viditelné světlo (katodoluminiscence) a teplo. Pro SEM analýzu se nejběžněji využívají sekundární a zpětně odražené elektrony [41]. Sekundární elektrony jsou primárním svazkem excitované elektrony, uvolněné z elektronových obalů atomů vzorku. Vznikají těsně pod povrchem vzorku a mají nízkou kinetickou energii. Nesou informaci o reliéfu vzorku s vysokým rozlišením. Zpětně odražené elektrony jsou primární elektrony odražené po srážce s jádrem atomu vzorku zpět od povrchu. Přitom si zachovávají relativně vysokou energii. Množství odražených elektronů a směr jejich odrazu závisí na složení vzorku, jeho povrchu, krystalinitě, popř. magnetických vlastnostech. Detekce těchto elektronů umožňuje sledovat prvkové složení povrchu vzorku [42].

V tubusu se nacházejí všechny součásti rastrovacího elektronového mikroskopu. Zdrojem elektronů může být žhavené wolframové vlákno nebo krystal hexaboridu lanthanu. Primární elektrony jsou urychlovány napětím mezi anodou a katodou. Na vzorek je pak takto vzniklý vysokoenergetický svazek elektronů fokusován soustavou elektromagnetických čoček. Pomocí rastrovacích cívek dochází k vychýlení svazku primárních elektronů, který potom skenuje plochu povrchu vzorku. Objektiv umístěný mezi rastrovacími cívkami a detektorem určuje rozlišovací schopnost elektronového mikroskopu. Vzorek je umístěn na pohyblivém stolku v komoře preparátů, měl by být vodivý a vysušený. Detektory jednotlivých signálů se nacházejí v blízkosti stolku se vzorkem. Pro detekci sekundárních a zpětně odražených elektronů slouží scintilátor, který po dopadu elektronu generuje foton ve viditelné oblasti. Ten je fotonásobičem převeden na elektrický signál, jenž je posléze

mnohonásobně zesílen a veden do počítače, který pomocí vhodného softwaru vytvoří a zobrazí zvětšený obraz vzorku na monitoru. Důležitou součástí rastrovacího elektronového mikroskopu je i vakuový systém udržující vakuum uvnitř mikroskopu [40, 43].

Pro analýzu hydratovaných a biologických vzorků slouží kryo-rastrovací elektronový mikroskop. Jedná se o rastrovací elektronový mikroskop vybavený tzv. kryo-držákem. Na něm lze vzorky fixované nejčastěji prudkým zchlazením v kapalném dusíku nebo zmrazením při vysokém tlaku pozorovat při velmi nízkých teplotách [44].

2.2.5 Diferenční kompenzační kalorimetrie

Tato metoda termické analýzy se zakládá na studiu změn chemických nebo fyzikálních vlastností různých látek prostřednictvím pozorování rozdílu tepelného toku analyzovaným a referenčním vzorkem při jejich zahřívání a chlazení. Jestliže v analyzovaném vzorku neprobíhají žádné změny, mají oba vzorky stejnou teplotu. Jestliže však k nějaké změně dojde, budou se ve vzorku odehrávat exotermní děje, při nichž se teplo uvolňuje (např. krystalizace), nebo endotermní děje, při nichž se teplo spotřebovává (např. tání, sublimace).

Existují dva základní typy provedení kalorimetrů, jejichž systémy se liší způsobem měření. Jedním z nich je DSC s tepelným tokem, při kterém je měřen rozdíl teplot analyzovaného a referenčního vzorku umístěných ve společné cele. Teplotní rozdíl je zaznamenán teplotním čidlem jako tepelný tok. V případě DSC s kompenzací příkonu jsou analyzovaný a referenční vzorek uspořádány v cele se dvěma oddělenými samostatnými tepelnými zdroji a teplotními čidly. Oba vzorky jsou tudíž zahřívány i snímány individuálně. Pokud během měření vznikne teplotní rozdíl mezi analyzovaným a referenčním vzorkem, odpovídající tepelný zdroj dodá potřebnou energii k opětovnému vyrovnání teplot. Tato energie je zaznamenána jako příkon [45, 46].

Vzorky jsou analyzovány v malém množství (v řádech mg) a do cel se vkládají v malých pánvičkách. Referenční vzorek představuje buď prázdnou pánvičku, nebo pánvičku s inertním materiálem. Výsledkem DSC analýz jsou křivky závislosti signálu (např. tepelného toku nebo příkonu) na teplotě nebo čase. Fyzikální či chemická změna během měření je znázorněna vychýlením křivky od základní čáry. Takto lze tedy pozorovat některé vlastnosti různých materiálů, např. teplotu tání, teplotu skelného přechodu, teplotu degradace, krystalizaci nebo měrnou tepelnou kapacitu [46, 47].

Zdokonalením klasické DSC je tzv. teplotně modulovaná DSC. Její princip spočívá ve skládání nelineárních sinusových modulací teploty, kdy se rychlost ohřevu (popř. chlazení) zvyšuje nebo snižuje podle předem daného programu. Získaný signál celkového tepelného toku je pak matematicky zpracován a rozdělen na jeho reverzibilní (termodynamickou) a nereverzibilní (kinetickou) složku. Reverzibilní složka signálu představuje např. změnu tepelné kapacity, zatímco nereverzibilní složka signálu může odpovídat chemickým reakcím nebo nerovnovážným fázovým přechodům (chladné krystalizaci, relaxaci). Díky tomu TMDSC umožňuje jednoduše od sebe oddělit a kvantifikovat jevy, které se v signálu celkového tepelného toku překrývají. Proto je tato metoda vhodná pro studium fyzikálních vlastností polymerů [56, 57].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Sledování vlastností PHB částic (granulí) je nezbytné pro vymezení jejich potenciálních aplikací. Velikost, tvar a stabilita těchto částic (granulí) se stávají důležitými parametry při jejich využití jako nosičů bioaktivních látek s řízeným a cíleným uvolňováním. Míra krystalinity polymeru uvnitř granulí pak ovlivňuje jeho mechanické vlastnosti.

Krystalinitu PHB lze měřit jak *in vivo* uvnitř bakteriálních buněk, tak i po izolaci granulí *in vitro*. V následující studii [58] je PHB uvnitř bakterií *Cupriavidus necator* H16 analyzován pomocí Ramanovy spektroskopie. Bakterie byly kultivovány na médiu obsahujícím fruktózu. Buňky byly nejprve promyty 50% ethanolem a odstředěny. Poté byly vysušeny při laboratorní teplotě a proměřeny na Ramanově spektroskopu v rozmezí 700 až 1 800 cm^{-1} . Ve většině případů zůstal PHB uvnitř buněk amorfni. V některých spektrech byla ovšem zaznamenána jeho krystalizace, což se projevilo zvýšením intenzity nebo posunem píku odpovídajícího PHB. Rozdíl mezi krystalickým a amorfniím stavem polymeru lze tedy jednoduše pozorovat polohou příslušného píku, přičemž amorfniímu stavu PHB by odpovídal pík při 1 736 cm^{-1} , zatímco hodnota vlnočtu pro krystalický stav PHB se může lišit až o 15 cm^{-1} .

Studiem různých stupňů krystalinity PHB v nativních granulích *in situ* se zabývala práce Michaela Portera a Jiana Yu [59]. Pomocí techniky ATR-FTIR byly analyzovány vzorky suspenzí bakterií *Cupriavidus necator* obsahujících PHB granule. Bakterie byly uchovány ve slabě kyselém prostředí za účelem inhibice buněčné aktivity. Mohly tak být pozorovány pouze vlivy podmínek vnějšího prostředí na chování PHB granulí. Krystalinita PHB byla pozorována ve vzorcích suspenzí neošetřených bakteriálních buněk, dále buněk odstředěných při vysokých otáčkách nebo zahříváných při teplotě 140 °C po dobu 2 hodin a následně ochlazených na laboratorní teplotu. Slabě kyselé prostředí, v němž se bakterie obsahující PHB granule nacházely, vyvolalo pouze nepatrnou krystalizaci polymeru. To znamená, že povrchová vrstva granulí zůstala z velké části neporušená, což zachovalo polymer v amorfniím stavu. Ke krystalizaci ve větším rozsahu docházelo po centrifugaci buněk při vysokých otáčkách. Díky vysoké odstředivé síle totiž dojde k natěsnání granulí na sebe, čímž se mohou mechanicky rozrušit. Největší krystalinity polymeru bylo dosaženo po zahřívání buněčné suspenze, kdy kromě odstranění vody uvnitř granulí nastaly změny i v intramolekulárním a intermolekulárním uspořádání polymeru. Oproti analýze Ramanovou spektroskopií je zde rozdíl mezi krystalickým a amorfniím stavem polymeru zaznamenán prostřednictvím různých intenzit píků příslušejících vibracím krystalické nebo amorfnií fáze polymeru.

O sledování rozdílu krystalinity PHB v živých buňkách a po jeho izolaci pojednává publikace [60]. Pro tento experiment byly použity kmeny bakterií *Cupriavidus necator* H16 a *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347. Polymer byl analyzován v živých bakteriálních buňkách, v lyofilizovaných buňkách a po jeho izolaci. Amorfnií stav polymeru v živých buňkách byl potvrzen absencí endotermního píku tání pomocí DSC. Izolovaný polymer přešel do amorfniího stavu prudkým zchlazením jeho taveniny. Za předpokladu přítomnosti plastifikující složky v granulích by teplota skelného přechodu polymeru v živých buňkách měla být znatelně nižší než pro izolovaný polymer. Výsledky měření DSC ovšem ukázaly, že teplota skelného přechodu izolovaného polymeru byla vždy stejná nebo nepatrně nižší

než u polymeru v živých buňkách, a to v případě obou použitých kmenů. Z toho lze usoudit, že PHB v nativní formě neobsahuje žádnou výrazně účinnou plastifikující složku, která by zabraňovala krystalizaci tohoto polymeru po jeho izolaci.

Izolaci nativních PHB granulí z bakterie *Cupriavidus necator*, jejich další úpravou a charakterizací krystalinity polymeru se ve své práci zabývali Yasushi Kawaguchi a Yoshiharu Doi [61]. Bakterie byly kultivovány na médiu obsahujícím fruktózu. PHB granule z nich byly izolovány pomocí enzymů (lysozymu a deoxyribonukleázy) s využitím ultrasonifikace. Izolované granule pak byly ošetřeny vodnými roztoky acetonu o různých koncentracích, roztokem chlornanu sodného a hydroxidu sodného nebo enzymy (trypsinem a lipázou). Po úpravě byly ošetřené PHB granule vždy odděleny centrifugací a analyzovány rentgenovou difraktometrií. Výsledky měření ukázaly, že neošetřené PHB granule se nacházely víceméně v amorfním stavu (v difraktogramech se nevyskytovaly žádné ostré píky). S rostoucí koncentrací vodného roztoku acetonu při jejich úpravě se ovšem zvyšoval podíl krystalické části polymeru. Úprava granulí roztokem chlornanu sodného a hydroxidu sodného rovněž způsobila krystalizaci PHB. Působením alkálií totiž došlo k odstranění určitého množství proteinů a lipidů z povrchové stabilizační vrstvy granulí. Inkubace PHB granulí s enzymy zapříčinila štěpení proteinů v případě použití trypsinu, popř. štěpení lipidů v případě použití lipázy. Lipáza však byla při procesu krystalizace polymeru účinnější.

Sledování krystalinity PHB v granulích se věnuje i publikace [62]. Ty byly izolovány obdobným způsobem jako v předchozí studii a charakterizovány pomocí TEM, FTIR, rentgenové difraktometrie a DSC. Ze snímků TEM bylo patrné, že granule po lyofilizaci měly strukturu nekystalického jádra a krystalického povrchu. Jakmile byly zahřívány při vyšších teplotách (120 °C a 150 °C), začaly se v jádru granulí tvořit lamelární krystaly polymeru. V získaných FTIR spektrech byly zaznamenány široké pásy vibrací v rozmezí 3 500 až 3 300 cm⁻¹, které odpovídaly přítomnosti –OH skupiny. Tento fakt dokazuje, že se uvnitř PHB granulí vyskytovalo určité množství vody vázané na polymer zřejmě prostřednictvím vodíkových vazeb. Tato voda byla odstraněna až vakuovým vysušením granulí, což způsobilo krystalizaci polymeru uvnitř granulí, která byla detekována pomocí rentgenové difraktometrie. Na základě DSC analýzy byla stanovena teplota skelného přechodu PHB granulí v rozmezí –0,5 až 4 °C. Výsledky této studie naznačují, že voda je zodpovědná za udržení jádra PHB granulí v amorfním stavu.

Za zmínku stojí i studie založená na spolupráci výzkumných pracovníků z Boloňské a Nové lisabonské univerzity [63]. Jediným zdrojem uhlíku, který byl využit pro tvorbu PHB bakteriemi *Cupriavidus necator* DSM 428, byl odpadní fritovací olej. PHB granule byly z bakterií izolovány pomocí alkalázy, SDS a EDTA. Úloha SDS při izolaci granulí spočívá v rozrušení buněčných struktur bakterií. Molekuly EDTA vytváří komplexy s dvojmocnými kationty (hlavně vápenatými a hořečnatými), čímž dochází k destabilizaci vnější strany cytoplazmatické membrány. Po lýzi bakteriálních buněk je rozrušený buněčný materiál rozložen alkalázou, přičemž nerozpuštěné buněčné zbytky se inkorporují do vznikajících SDS micel. Vysušené izolované PHB granule pak byly studovány pomocí DSC. Při teplotě 3 °C byl stanoven skelný přechod polymeru. Exotermní pík při 60 °C odpovídal studené krystalizaci a endotermní pík při 172 °C teplotě tání polymeru. Výsledky z rentgenové difraktometrie potvrdily, že PHB v granulích ve vlhkém stavu izolovaných výše popsáním způsobem zůstal amorfní. Naopak po jejich vysušení, kdy došlo ke ztrátě

vody a následné kontrakci doprovázené rozrušením povrchové vrstvy granulí, polymer zkrystalizoval.

Přípravou a charakterizací umělé PHB granulí se zabývá publikace [64]. Byly připraveny dispergací roztoku PHB v chloroformu s dvacetinásobným množstvím vodného roztoku surfaktantu pomocí ultrazvuku. Organické rozpouštědlo bylo ze směsi odstraněno zahříváním, mícháním při laboratorní teplotě nebo dialýzou proti vodnému roztoku surfaktantu. Jako surfaktanty byly použity kationogenní detergenty (např. CTAB a jiné kvarterní amoniové tenzidy), anionogenní detergenty (např. SDS a choláty), neionogenní detergenty nebo soli mastných kyselin. Vzniklá disperze pak obsahovala amorfní granule stabilizované vrstvou surfaktantu. Pomocí rozptylu světla a TEM byla stanovena jejich velikost v rozmezí 0,1 až 0,4 μm . Doba působení ultrazvuku, povaha surfaktantu ani jeho koncentrace velikost granulí příliš neovlivnily. Jejich krystalinita byla studována pomocí rentgenové difraktometrie. Na výsledném difraktogramu pak bylo možné pozorovat odezvu odpovídající amorfnímu stavu polymeru. Po vysušení umělé PHB granulí a jejich zahřívání při 125 °C krystalinita polymeru dosáhla kvůli destabilizaci povrchové vrstvy surfaktantu 73 %. Stejně tak odstraněním povrchové vrstvy umělé granulí pomocí dialýzy proti vodě došlo k jejich značné flokulaci a následné krystalizaci. Umělé PHB granule byly ovšem stabilizovány i jiným způsobem. Odstředěné granule obalené cholátem sodným byly rozpuštěny v pufru se sójovými fosfolipidy. Tato suspenze pak byla dispergována s pufrem obsahujícím cholát sodný. Vzniklá směs pak byla dialyzována proti fosfátovému pufru s polymerní pryskyřicí za účelem odstranění cholátu. Díky přítomnosti fosfolipidů, které vytvořily novou stabilizační vrstvu, zůstaly umělé PHB granule vůči krystalizaci odolné.

Stabilizaci umělé PHB granulí lze však provést také pomocí proteinů vyskytujících se v povrchové vrstvě nativních PHB granulí. Za tímto účelem byly ve studii [65] použity phasiny a PHB depolymeráza. Phasiny byly vyrobeny a specificky označeny metodami genetického inženýrství s využitím příslušných plasmidů bakterií *Cupriavidus necator* a *Escherichia coli*. Extracelulární PHB depolymeráza byla izolována z kultury *Ralstonia pickettii*. Umělé granule byly připraveny dispergací chloroformového roztoku PHB a vodného roztoku phasinu a deoxycholátu sodného, přičemž chloroform byl z výsledné disperze odstraněn mícháním při laboratorní teplotě nebo při 65 °C. Ze SEM snímků je možné usoudit, že odstranění chloroformu při laboratorní teplotě vedlo ke vzniku velikostně i tvarově jednodušších PHB granulí. Ve směsi bez phasinů (pouze s deoxycholátem) se vyskytovaly granule nepravidelných tvarů a různých velikostí. S rostoucí koncentrací phasinů ve směsi ale granule získávaly jednodušší kulovitější tvar a jejich rozměry se mírně zvětšovaly. Inkorporace PHB depolymerázy do povrchové vrstvy umělé granulí byla zajištěna přidáním tohoto enzymu do vodné fáze před samotnou dispergací směsi. Takové granule pak byly schopny autodegradace.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiály

Bakterie	<i>Cupriavidus necator</i> H16, kmen získán z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně
PHB	Polyhydroxybutyrate, Biomer, č. šarže 120
CTAB	Hexadecyltrimethylammonium bromide, $\geq 99 \%$, $M_w = 364,45 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, CAS 57-09-0, SIGMA-ALDRICH spol. s r.o., č. šarže SLBJ9504V
TTAB	Tetradecyltrimethylammonium bromide, $\geq 98 \%$, $M_w = 336,41 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, CAS 1119-97-7, SIGMA-ALDRICH spol. s r.o., č. šarže 1377175 40808244
SDS	Sodium dodecyl sulfate, $\geq 99 \%$, $M_w = 288,38 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, CAS 151-21-3, SIGMA-ALDRICH spol. s r.o., č. šarže MKCB1798V
TWEEN® 20	TWEEN® 20, $M_w = 1\,228 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, CAS 9005-64-5, SIGMA-ALDRICH spol. s r.o., č. šarže SZBF1740V
Lecitin	Lecithin from soybean, CAS 8002-43-5, SERVA Electrophoresis GmbH, č. šarže 130571
Cholesterol	Cholesterol, $M_w = 386,7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, CAS 57-88-5, SERVA Electrophoresis GmbH, č. šarže 100085
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane, 99,7 %, $M_w = 121,14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, CAS 77-86-1, Lach-Ner, s.r.o.
HCl	Hydrochloric acid, 35 % g. r., $M_w = 36,46 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, CAS /1, Lach-Ner, s.r.o.
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate g. r., $M_w = 372,24 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, CAS 6381-92-6, Lach-Ner, s.r.o.
NaCl	Sodium chloride g. r., $\geq 99,5 \%$, $M_w = 58,44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, Lach-Ner, s.r.o.
KCl	Chlorid draselný čistý, $M_w = 74,56 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, CAS 7447-40-7, Lach-Ner, s.r.o.
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p. a., $M_w = 156,01 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, CAS 13472-35-0, PENTA s.r.o.
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát p. a., $M_w = 177,99 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, CAS 10028-24-7, PENTA s.r.o.
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Magnesium chloride hexahydrate g. r., $M_w = 203,30 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, CAS 7791-18-6, LACHEMA, a.s.
NaClO	Sodium hypochlorite, 6–14 % Cl active, $M_w = 74,44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, CAS 7681-52-9, Honeywell Riedel-de Haën®, č. šarže 13440
Lysozym	Lysozyme from chicken egg, $M_w = 14,3 \text{ kDa}$, CAS 12650-88-3, SIGMA-ALDRICH spol. s r.o., č. šarže BCBP6286V
Deoxyribonukleáza	Deoxyribonuclease I from bovine pancreas, $M_w = 31 \text{ kDa}$,

	CAS 9003-98-9, SIGMA-ALDRICH spol. s r.o., č. šarže 056K7680
Alkaláza	Alcalase® CLEA, $\geq 5 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, SIGMA-ALDRICH spol. s r.o., č. šarže BCBR2330V
Lipáza	Lipase from <i>Rhizopus oryzae</i> , $M_w = 43 \text{ kDa}$, CAS 9001-62-1 SIGMA-ALDRICH spol. s r.o., č. šarže BCBC8501
Chloroform	Chloroform stab. with amylene, $M_w = 119,38 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, CAS 67-66-3, Lach-Ner, s.r.o.
Dichlormethan	Dichlormethane, $M_w = 84,93 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, CAS 75-09-2, Lach-Ner, s.r.o.
Aceton	Acetone, $M_w = 58,08 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, CAS 67-64-1, Lach-Ner, s.r.o.
Voda	demineralizovaná voda Purelab flex ELGA

4.2 Použité přístroje

Zetasizer Nano ZS	Malvern Instruments Ltd.
Infračervený spektrometr	Nicolet iS50 FT-IR, jednodrazový diamantový nástavec iS50 ATR, iS50 Raman Modul; spektrální rozsah $15\text{--}27\,000 \text{ cm}^{-1}$, Thermo Fisher Scientific Inc.
Diferenční kompenzační kalorimetr	DSC Q2000, TA Instruments
Analytické váhy	Denver Instrument, max. 220 g, přesnost $0,0001 \text{ g}$
Ultrazvuková lázeň	BANDELIN Sonorex Digitec, typ DT 31 H, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, $f = 35 \text{ kHz}$
Ultrazvuk	BANDELIN SONOREX TECHNIK, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG
Vodní lázeň	Heidolph Instruments, rozmezí teplot $20\text{--}100 \text{ }^{\circ}\text{C}$
Vysokorychlostní centrifuga	typ Z 36 HK, HERMLE Labortechnik GmbH, max. $30\,000 \text{ ot./min}$, $P = 1,6 \text{ kW}$
Mikrocentrifuga	Sigma 1-14 Microfuge, Sartorius AG, max. $14\,800 \text{ ot./min}$
pH metr	SensoDirect pH 200, Tintometer GmbH
Třepačka	Heidolph Unimax 1010, Heidolph Instruments
Inkubátor	Heidolph Inkubator 1000, Heidolph Instruments

4.3 Příprava a charakterizace umělé PHB granule

4.3.1 Optimalizace rozpouštění krystalického PHB

Dvě navážky 25 mg PHB byly rozpouštěny v 5 cm^3 chloroformu, resp. dichlormethanu. Ke každému roztoku bylo přidáno 100 cm^3 zásobního roztoku CTAB o koncentraci $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Obě směsi byly umístěny do ultrazvukové lázně vytemperované na $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, aby došlo ke stabilizaci rozpouštěného PHB použitým surfaktantem. Po 20 minutách ultrasonifikace bylo z obou směsí ve vodní lázni vyhřáté na $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ odpařováno organické rozpouštědlo po dobu 90 minut.

Na přístroji Zetasizer Nano ZS byla u obou vzorků proměřena distribuce velikosti vytvořených PHB granulí a jejich zeta potenciál. Měření bylo uskutečněno ve skleněných kyvetách, do nichž byla v případě ELS analýzy vložena Dip cela. Každý vzorek byl proměřen celkem třikrát a mezi jednotlivými měřeními byla nastavena časová prodleva 5 s.

4.3.2 Studium vlivu teploty a délky působení ultrazvukové lázně

Jednotlivé navážky 25 mg PHB byly vždy rozpuštěny v 5 cm³ chloroformu, který se na základě předchozí části experimentu ukázal být vhodnějším rozpouštědlem. Ke každému roztoku bylo přidáno 100 cm³ zásobního roztoku CTAB o koncentraci 0,05 mol·dm⁻³. Směsi byly uloženy do ultrazvukové lázně vytemperované na 25 °C, 35 °C nebo 40 °C. Jednotlivé vzorky byly ze směsí odebírány vždy po 10, 20, 30 minutách ultrasonifikace a také po dvou a třech desetiminutových intervalech ultrasonifikace s pětiminutovou přestávkou mezi nimi. Ze všech získaných vzorků umístěných ve vodní lázni vyhřáté na 60 °C byl chloroform odpařován po dobu 90 minut.

Na přístroji Zetasizer Nano ZS byla u všech vzorků proměřena distribuce velikosti vytvořených PHB granulí a jejich zeta potenciál při stejném nastavení a stejných podmínkách jako v předchozím případě.

4.3.3 Optimalizace postupu odpaření rozpouštědla

Směsi roztoku CTAB a rozpuštěného PHB byly připraveny způsobem popsaným v kapitole 4.3.2. Dále byly uloženy do ultrazvukové lázně vytemperované na 35 °C, přičemž vzorky byly odebrány po 20 a 30 minutách ultrasonifikace. Při této teplotě a době působení ultrazvuku vykazovaly vzniklé umělé PHB granule v předchozí části experimentu nejvhodnější vlastnosti. Ze vzorků byl chloroform odpařován ve vodní lázni vyhřáté na 50 °C, 60 °C, 70 °C nebo 80 °C po dobu 90 minut, popř. při laboratorní teplotě za stálého míchání na magnetické míchačce.

Na přístroji Zetasizer Nano ZS byla u všech vzorků proměřena distribuce velikosti vytvořených PHB granulí a jejich zeta potenciál při stejném nastavení a stejných podmínkách jako v předchozích případech. Vzorky umístěné na magnetické míchačce byly proměřeny po 1 a 2 dnech míchání.

4.3.4 Studium vlivu povahy stabilizačních látek

Jednotlivé navážky 25 mg PHB byly rozpuštěny v 5 cm³ chloroformu. Ke každému roztoku bylo přidáno 100 cm³ předem připraveného roztoku surfaktantu (CTAB, TTAB, SDS nebo TWEEN® 20) o koncentraci 0,05 mol·dm⁻³. Směsi byly uloženy do ultrazvukové lázně vytemperované na 35 °C, přičemž vzorky byly odebrány po 20 a 30 minutách ultrasonifikace. Ze vzorků byl chloroform odpařován ve vodní lázni vyhřáté na 60 °C po dobu 90 minut. Při této teplotě odpařování chloroformu vykazovaly vzniklé umělé PHB granule v předchozí části experimentu nejvhodnější vlastnosti.

Další směs byla připravena rozpuštěním 10 mg PHB, 80 mg lecitinu a 10 mg cholesterolu v 1 cm³ chloroformu, k němuž bylo přidáno 10 cm³ demineralizované vody. Tato směs byla dispergována pomocí tyčového ponorného ultrasonifikátoru po dobu 1 minuty při frekvenci 20 kHz za současného chlazení studenou vodou. Ze vzniklé disperze byl chloroform odpařován za stálého míchání na magnetické míchačce vyhřáté na 60 °C po dobu 45 minut.

Na přístroji Zetasizer Nano ZS byla u všech vzorků proměřena distribuce velikosti vytvořených PHB granulí a jejich zeta potenciál při stejném nastavení a stejných podmínkách jako v předchozích případech.

4.3.5 Charakterizace umělého lecitinových PHB granulí ostatními metodami

Před každou analýzou bylo nejprve odebráno 1,5 cm³ suspenze umělého lecitinových PHB granulí (připravených dle postupu uvedeného v podkapitole 4.3.4) do zkumavky Eppendorf a odstředěno v mikrocentrifuze při 5 000 ot./min po dobu 5 minut. Vlhký sediment byl nanesen na ATR nástavec přístroje Nicolet iS50 a posléze byla zaznamenávána infračervená spektra v čase po dobu 30 minut s počtem skenů 8.

Ramanovo spektrum umělého lecitinových PHB granulí bylo změřeno na stejném přístroji prostřednictvím Raman modulu s rozlišením 8 a počtem skenů 128. Vlnová délka excitačního laseru činila 1 064 nm.

Změny fyzikálních vlastností PHB uvnitř umělého lecitinových granulí v závislosti na teplotě byly studovány pomocí TMDSC. Vlhký sediment byl analyzován v uzavřené hliníkové pánvičce v teplotním rozpětí od 25 °C do 200 °C s krokem 2 °C/min a modulací 0,53 °C každých 100 s.

4.4 Izolace a charakterizace nativních PHB granulí

4.4.1 Izolace nativních PHB granulí pomocí lysozymu, deoxyribonukleázy a mechanického rozrušení buněk ultrazvukem

Nativní PHB granule byly izolovány z bakterií *Cupriavidus necator* H16, které byly centrifugovány při 5 000 ot./min po dobu 15 minut, aby došlo k jejich oddělení od média. Po slití supernatantu byl sediment resuspendován ve 100 cm³ předem připraveného Tris-HCl pufru o koncentraci 0,05 mol·dm⁻³ a pH = 8 obsahujícího také přesně 0,100 g lysozymu a EDTA o výsledné koncentraci v roztoku 0,001 mol·dm⁻³. Vzniklá suspenze byla míchána 3 hodiny v Erlenmeyerově baňce na třepačce vyhřáté na 40 °C. Oddělený sediment byl resuspendován ve studené vodě. Suspenze byla umístěna do ledové lázně a pro definitivní rozbití buněčných struktur použitých bakterií byla opakovaně celkem šestkrát vždy po dobu 30 s ultrasonifikována pomocí tyčového ponorného ultrasonifikátoru při frekvenci 20 kHz. Dále byla suspenze centrifugována při 5 000 ot./min po dobu 15 minut. Sediment byl resuspendován ve 100 cm³ předem připraveného fosfátového pufru (pH = 7,4) obsahujícího také 0,001 g deoxyribonukleázy a chlorid hořečnatý o výsledné koncentraci v roztoku 0,01 mol·dm⁻³. Tato suspenze byla míchána 2 hodiny v Erlenmeyerově baňce na třepačce vyhřáté na 40 °C a následně centrifugována při 5 000 ot./min po dobu 15 minut. Oddělený sediment sestávající již z většiny z PHB granulí a malého množství nerozpuštěných buněčných zbytků byl resuspendován v 20 cm³ Tris-HCl pufru o koncentraci 0,05 mol·dm⁻³ a pH = 8.

Pro purifikaci PHB granulí od dosud neoddělených buněčných artefaktů byla vzniklá suspenze vpravena do dialyzační membrány a dialyzována proti 1 dm³ Tris-HCl pufru o koncentraci 0,02 mol·dm⁻³ a pH = 8 za stálého míchání na magnetické míchačce po dobu 1 dne. Suspenze izolovaných PHB granulí byla po ukončení dialýzy uchovávána v ledničce.

4.4.2 Izolace nativních PHB granulí pomocí alkalázy a SDS

Nativní PHB granule byly izolovány z bakterií *Cupriavidus necator* H16, které byly od média odděleny stejným způsobem jako v předchozím případě. Sediment byl následně resuspendován ve 100 cm³ předem připraveného fosfátového pufru (pH = 7,4) obsahujícího také přesně 0,090 g alkalázy, 0,450 g SDS a 0,030 g EDTA. Vzniklá suspenze byla míchána 1 hodinu v Erlenmeyerově baňce na třepačce vyhřáté na 55 °C. Poté byla centrifugována při 12 000 ot./min po dobu 30 minut. Po slití supernatantu byl sediment třikrát promyt destilovanou vodou a vždy centrifugován při 10 000 ot./min po dobu 15 minut, aby se odstranily buněčné zbytky a přebytečné množství použitého detergentu a enzymu. Oddělený sediment byl resuspendován ve 20 cm³ Tris-HCl pufru o koncentraci 0,05 mol·dm⁻³ a pH = 8. Suspenze izolovaných PHB granulí byla uchovávána v ledničce.

4.4.3 Charakterizace nativních PHB granulí

Před analýzou pomocí ATR-FTIR, Ramanovy spektroskopie a DSC bylo nejprve odebráno 1,5 cm³ suspenze nativních PHB granulí (izolovaných dle postupů uvedených v podkapitolách 4.4.1 a 4.4.2) do zkumavky Eppendorf a odstředěno v mikrocentrifuze při 5 000 ot./min po dobu 5 minut. Vlhký sediment byl nanesen na ATR nástavec přístroje Nicolet iS50 a posléze byla zaznamenávána infračervená spektra v čase po dobu 30 minut v případě granulí izolovaných prvním způsobem a po dobu 90 minut v případě granulí izolovaných druhým způsobem s počtem skenů 8.

Ramanovo spektrum nativních PHB granulí (izolovaných dle postupů uvedených v podkapitolách 4.4.1 a 4.4.2) bylo změřeno na stejném přístroji prostřednictvím Raman modulu s rozlišením 8 a počtem skenů 128. Vlnová délka excitačního laseru činila 1 064 nm.

Na přístroji Zetasizer Nano ZS byly proměřeny distribuce velikosti izolovaných nativních PHB granulí pomocí techniky DLS a jejich zeta potenciál pomocí techniky ELS. Měření bylo uskutečněno se vzorkem suspenze ve skleněných kyvetách, do nichž byla v případě ELS analýzy vložena Dip cela. Každý vzorek byl proměřen celkem třikrát a mezi jednotlivými měřeními byla nastavena časová prodleva 5 s.

Změny fyzikálních vlastností PHB uvnitř nativních granulí v závislosti na teplotě byly studovány pomocí TMDSC. Vlhký sediment byl analyzován v uzavřené hliníkové pánvičce v teplotním rozpětí od 25 °C do 200 °C s krokem 2 °C/min a modulací 0,53 °C každých 100 s.

4.5 Úprava nativních PHB granulí a jejich charakterizace

4.5.1 Úprava nativních PHB granulí chlornanem sodným

Část suspenze nativních PHB granulí (izolovaných postupy uvedenými v podkapitolách 4.4.1 a 4.4.2) byla smísená s roztokem chlornanu sodného v poměru 1:5. Směs byla míchána na magnetické míchačce při laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Poté k ní bylo přidáno takové množství 35% kyseliny chlorovodíkové, aby výsledné pH bylo rovno 7. Směs byla nadále třikrát promyta destilovanou vodou a vždy poté centrifugována při 5 000 ot./min po dobu 10 minut, aby se odstranil vzniklý chlorid sodný. Oddělený sediment byl resuspendován v 10 cm³ Tris-HCl pufru o koncentraci 0,05 mol·dm⁻³ a pH = 8.

4.5.2 Úprava nativních PHB granulí lipázou

Část suspenze nativních PHB granulí (izolovaných postupy uvedenými v podkapitolách 4.4.1 a 4.4.2) byla smísena s Tris-HCl pufrům o koncentraci $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $\text{pH} = 8$ obsahujícího také 10 mg lipázy v poměru 1:5. Směs byla míchána v Erlenmeyerově baňce na třepačce vyhřáté na 40°C po dobu 2 hodin. Poté byla centrifugována při 5 000 ot./min po dobu 10 minut. Oddělený sediment byl resuspendován v 10 cm^3 Tris-HCl pufru o koncentraci $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $\text{pH} = 8$.

4.5.3 Úprava nativních PHB granulí acetonem

Část suspenze nativních PHB granulí (izolovaných postupy uvedenými v podkapitolách 4.4.1 a 4.4.2) byla smísena s 50% vodným roztokem acetonu v poměru 1:5. Směs byla míchána na magnetické míchačce při laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Poté byla centrifugována při 5 000 ot./min po dobu 10 minut. Oddělený sediment byl resuspendován v 10 cm^3 Tris-HCl pufru o koncentraci $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $\text{pH} = 8$.

4.5.4 Charakterizace upravených nativních PHB granulí

Před analýzou pomocí ATR-FTIR a Ramanovy spektroskopie bylo nejprve odebráno $1,5 \text{ cm}^3$ suspenze různě upravených nativních PHB granulí do zkumavky Eppendorf a odstředěno v mikrocentrifuze při 5 000 ot./min po dobu 5 minut. Vlhký sediment byl nanesen na ATR nástavec přístroje Nicolet iS50. Technikou ATR-FTIR byly proměřeny pouze vzorky upravených granulí izolovaných pomocí alkalázy a SDS. Jejich infračervená spektra byla zaznamenávána v čase po dobu 120 minut. Nastavení průběhu analýzy bylo stejné jako v případě charakterizace neošetřených nativních granulí (viz podkapitola 4.4.3).

Na přístroji Zetasizer Nano ZS byly proměřeny distribuce velikosti všech různě upravených nativních PHB granulí pomocí techniky DLS a jejich zeta potenciál pomocí techniky ELS. Měření bylo uskutečněno se vzorkem suspenze ve skleněných kyvetách, do nichž byla v případě ELS analýzy vložena Dip cela. Každý vzorek byl proměřen celkem třikrát a mezi jednotlivými měřeními byla nastavena časová prodleva 5 s.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Příprava a charakterizace umělého PHB granulí

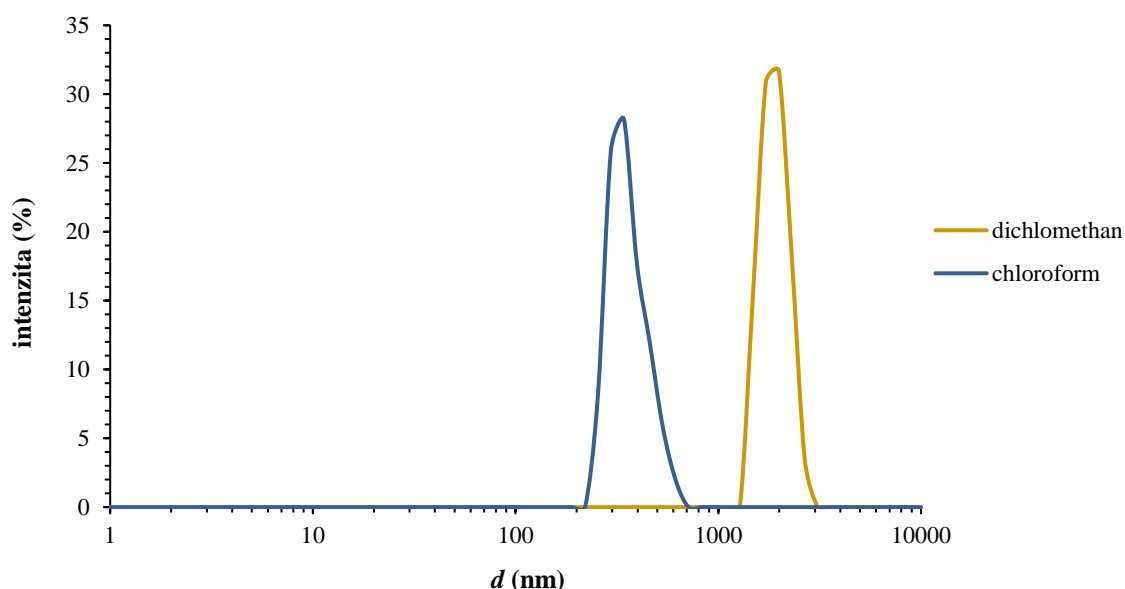
První část práce byla zaměřena na optimalizaci přípravy umělého PHB granulí. Pro tyto účely byl využit krystalický PHB (komerční produkt zakoupený od firmy Biomer). Nejprve bylo nutné nalézt jeho vhodné rozpouštědlo (podkapitola 5.1.1), následně byla optimalizována teplota a způsob přípravy umělého PHB granulí (podkapitoly 5.1.2 a 5.1.3). V poslední části této kapitoly pak byla porovnávána jednotlivá činidla použitelná pro stabilizaci umělého PHB granulí (podkapitola 5.1.4). Ve všech případech pak byly jednotlivé připravené vzorky vždy charakterizovány metodami rozptylu světla. Pomocí dynamického rozptylu světla byly získány distribuce velikosti částic a pomocí elektroforetického rozptylu světla byly získány hodnoty zeta potenciálu.

Umělé PHB granule s nejpříjemnějšími stanovenými vlastnostmi pak dále byly charakterizovány pomocí ATR-FTIR, Ramanovy spektroskopie a DSC. Získané poznatky z této části práce byly posléze využity při nastavení metod izolace nativních PHB granulí z bakteriálních buněk v následujících kapitolách.

5.1.1 Optimalizace rozpouštění krystalického PHB

V této části práce byly nejprve porovnány vzorky umělého PHB granulí připravených rozpouštěním krystalického PHB v dichlormethanu a chloroformu. Tato dvě rozpouštědla byla zvolena na základě zdrojů [16] a [64].

Vhodné rozpouštědlo krystalického PHB bylo vybráno na základě distribucí velikosti vzniklých umělého PHB granulí a zprůměrovaných hodnot zeta potenciálů.



Obr. 8: Distribuce velikosti umělého PHB granulí vzniklých rozpouštěním krystalického PHB v dichlormethanu popř. v chloroformu (hodnoty velikostí jsou na vodorovné ose uvedeny v logaritmickém měřítku)

Obr. 8 znázorňuje závislost intenzity rozptýleného světla jednotlivými frakcemi uměle připravených PHB granulí na jejich velikosti. Je patrné, že po rozpuštění polymeru v dichlormethanu vznikaly granule větších rozměrů než v případě chloroformu.

Průměrné hodnoty velikosti vzniklých granulí, jejich zeta potenciálu a indexu polydisperzity jsou včetně směrodatných odchylek uvedeny v Tab. 2. Z naměřených hodnot je zřejmé, že více polydisperzní systém vznikl po rozpuštění PHB v dichlormethanu. Avšak díky vysoké hodnotě kladného povrchového náboje uměle připravených granulí (přesněji řečeno náboje na jejich rovině skluzu) byly oba vzorky stabilní vůči agregaci. Jejich zeta potenciál byl v obou případech kladný, což bylo způsobeno přítomností kationaktivního tenzidu CTAB, který byl využit pro jejich stabilizaci.

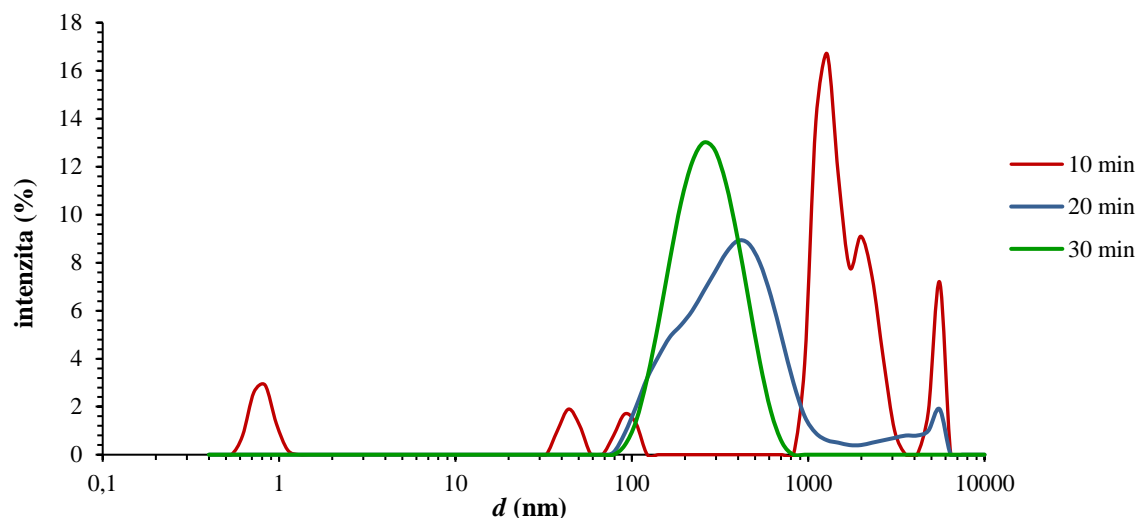
Jelikož se hodnoty zeta potenciálu uměle připravených granulí v obou vzorcích příliš nelišily, byl s ohledem na velikost připravených granulí a index polydisperzity jako vhodnější rozpouštědlo zvolen chloroform.

Tab. 2: Průměrné hodnoty velikosti (d), indexu polydisperzity (\bar{D}) a zeta potenciálu (ζ) uměle připravených PHB granulí připravených rozpuštěním polymeru v dichlormethanu a chloroformu

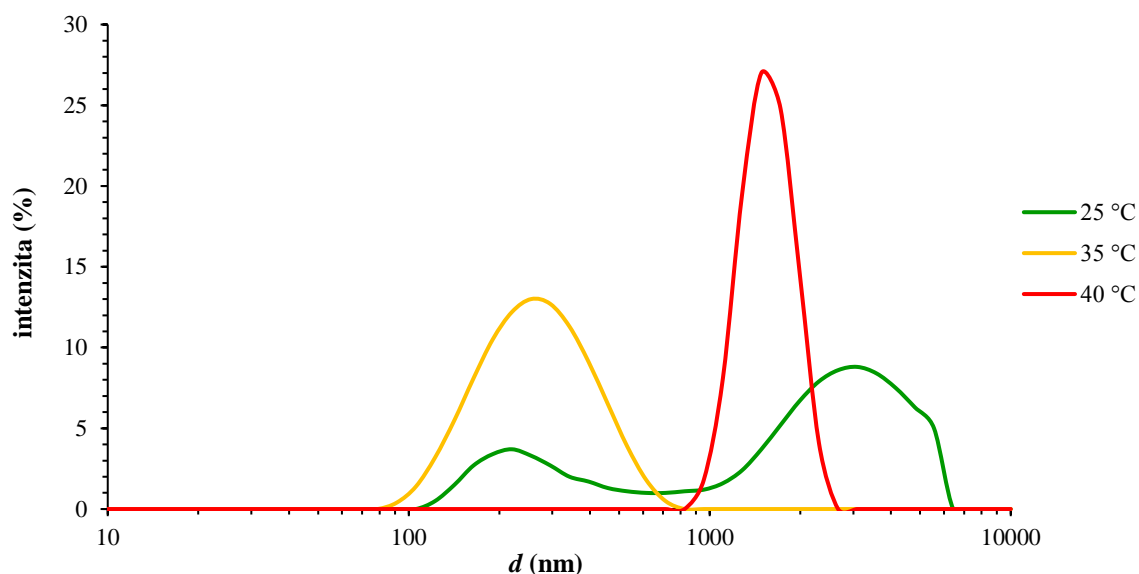
rozpuštědlo	d (nm)	\bar{D} (–)	ζ (mV)
dichlormethan	$1\,908,00 \pm 12,02$	$0,63 \pm 0,01$	$49,87 \pm 1,86$
chloroform	$363,10 \pm 66,58$	$0,24 \pm 0,18$	$51,57 \pm 4,02$

5.1.2 Studium vlivu teploty a délky působení ultrazvukové lázně

Cílem další části experimentu bylo určit, při jaké teplotě a po jaké době působení ultrazvukové lázně vznikají uměle připravené PHB granule s nejvyšší účinností a stabilitou, a zároveň s co nejmenší polydisperzitou. Pro všechny teploty a doby působení ultrazvuku byly vytvořeny distribuce velikosti vzniklých uměle připravených PHB granulí. V hlavní části této práce jsou pro příklad na Obr. 9 znázorněny distribuce pro teplotu ultrazvukové lázně 35 °C po 10, 20 a 30 minutách ultrasonifikace a na Obr. 10 distribuce po 30 minutách ultrasonifikace při 25 °C, 35 °C a 40 °C. Ostatní grafy jsou uvedeny v přílohách (viz kap. 9).



Obr. 9: Distribuce velikosti uměle připravených PHB granulí po 10, 20 a 30 minutách ultrasonifikace při 35 °C (hodnoty velikostí jsou na vodorovné ose uvedeny v logaritmickém měřítku)



Obr. 10: Srovnání distribucí velikosti umělé PHB granule po 30 minutách ultrasonifikace při 25 °C, 35 °C a 40 °C (hodnoty velikostí jsou na vodorovné ose uvedeny v logaritmickém měřítku)

Z Obr. 9 lze usoudit, že umělé granule nejvhodnější velikostí vznikly ve vzorcích odebraných po 20 a 30 minutách ultrasonifikace. Tyto dva vzorky také byly nejméně polydisperzní (viz Tab. 3). Oproti tomu vzorek odebraný po 10 minutách ultrasonifikace vykazoval vysokou polydisperzitu, a to zřejmě z důvodu nedokonalé dispergace směsi. Je dokonce možné, že vzorek obsahoval i samotné micely použitého surfaktantu lišící se svou menší velikostí. Z hlediska zeta potenciálu byly nejstabilnější vzorky odebrané po 20 a 30 minutách působení ultrazvuku.

Srovnání distribucí při různých teplotách po 30 minutách ultrasonifikace naznačuje, že umělé PHB granule měly nejpříjemnější velikost po ultrazvukové lázni při teplotě 35 °C. Při vyšší teplotě jejich velikost vzrostla. Dělo se tak pravděpodobně kvůli jejich agregaci, o čemž vypovídá hodnota zeta potenciálu. Granule ultrasonifikované při nižší teplotě měly vysokou polydisperzitu, což se projevilo vznikem dvou intenzitních píků v distribuci jejich velikosti. Střední hodnoty těchto píků proto byly v následující tabulce zvoleny jako průměrné hodnoty velikosti obou frakcí umělých granulí ve vzorku.

Tab. 3: Průměrné hodnoty velikosti, indexu polydisperzity a zeta potenciálu umělých PHB granulí po různých časech ultrasonifikace při 25 °C, 35 °C a 40 °C

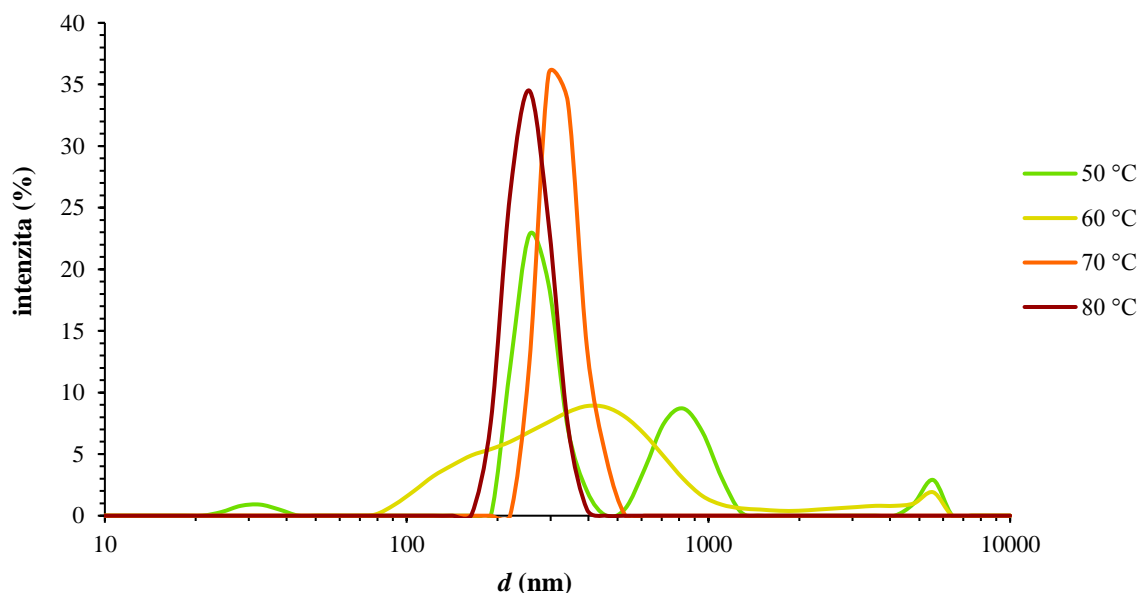
T_U (°C)	t_U (min)	d (nm)	\bar{D} (–)	ζ (mV)
25	30	$2\,930,00 \pm 4,24$	$1,00 \pm 0,00$	$29,53 \pm 1,35$
		$257,20 \pm 46,18$		
35	10	$3\,011,50 \pm 228,40$	$0,70 \pm 0,02$	$44,50 \pm 0,44$
	20	$430,90 \pm 10,11$	$0,40 \pm 0,08$	$56,95 \pm 1,06$
	30	$284,30 \pm 4,00$	$0,20 \pm 0,01$	$61,80 \pm 1,93$
40	30	$1\,570,00 \pm 53,74$	$0,28 \pm 0,05$	$29,17 \pm 3,32$

Průměrné hodnoty velikosti, indexu polydisperzity a zeta potenciálu umělé PHB granulí připravených ultrasonifikací při jiných teplotách byly vyhodnoceny na základě podobných kritérií a jsou uvedeny v tabulkách v oddílu Přílohy (viz kap. 9). V případě nižší teploty působení ultrazvukové lázně vznikaly ve všech vzorcích polydisperzní systémy umělé granulí. Při vyšší teplotě se vytvořené granule vyznačovaly většími rozměry (v řádu jednotek μm) a průměrná hodnota jejich velikosti byla ve většině případů zatížena velkou chybou. Celá řada analyzovaných vzorků vykazovala nízkou stabilitu vůči agregaci. Proto byla pro další fáze této části experimentu zvolena teplota ultrazvukové lázně $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ a doba jejího působení 20 a 30 minut.

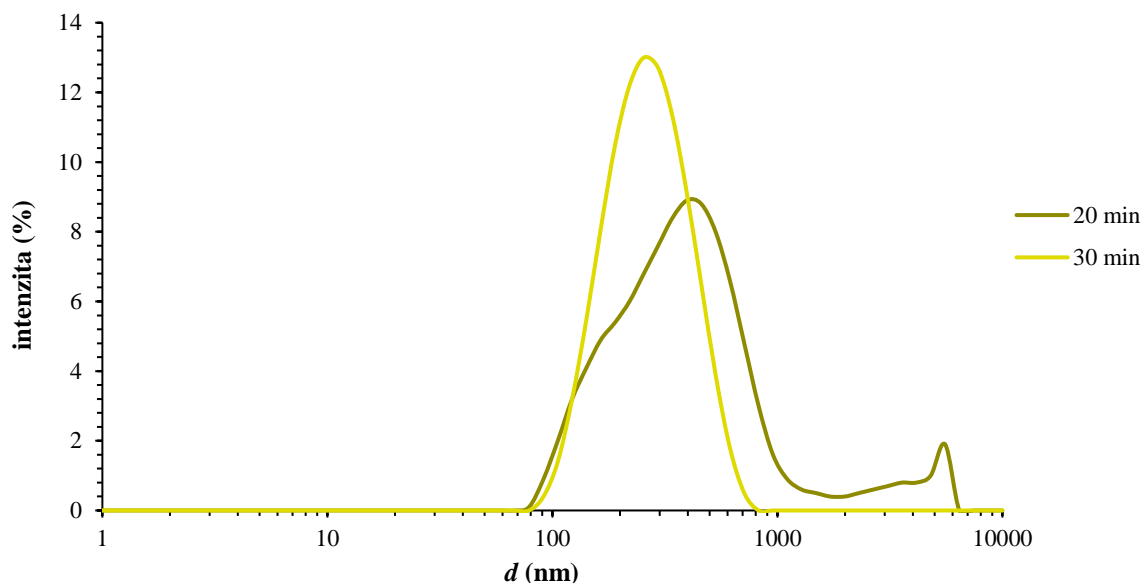
5.1.3 Optimalizace postupu odpaření rozpouštědla

Vliv teploty odpařování chloroformu na tvorbu umělé PHB granulí byl studován u dvou sad vzorků, a to po 20 a 30 minutách ultrasonifikace. Pro příklad jsou v hlavní části této práce uvedeny distribuce velikosti umělé granulí po odpařování rozpouštědla při všech teplotách po 20 minutách ultrasonifikace, resp. srovnání distribucí po odpařování rozpouštědla při $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ po obou časech ultrasonifikace. Ostatní výsledky lze nalézt v přílohách (viz kap. 9).

Z Obr. 11 je možné vyčíst, že po odpaření chloroformu při $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ vznikla distribuce s více frakcemi částic o různé velikosti, což se projevilo i vyšší hodnotou indexu polydisperzity. Vyšší polydisperzita byla způsobena nejspíš pomalým a nedostatečným odpařováním chloroformu ze vzorků. Při vyšší teplotě odpařování byla polydisperzita nižší a stejně tak se snižovala i velikost vytvořených umělé PHB granulí.



Obr. 11: Distribuce velikosti umělé PHB granulí po 20 minutách ultrasonifikace a odpařování rozpouštědla při různých teplotách (hodnoty velikostí jsou na vodorovné ose uvedeny v logaritmickém měřítku)



Obr. 12: Srovnání distribucí velikosti umělé PHB granulí po 20 a 30 minutách ultrasonifikace a odpařování rozpouštědla při 60 °C (hodnoty velikostí jsou na vodorovné ose uvedeny v logaritmickém měřítku)

Obr. 12 naznačuje, že delší doba ultrasonifikace před odpařením chloroformu ze vzorku měla na tvorbu umělé PHB granulí lepší vliv. Projevilo se to jejich menší velikostí a nižší hodnotou indexu polydisperzity. Elektrostatickou stabilitu vůči agregaci částic vykazovaly všechny analyzované vzorky. Průměrné hodnoty velikostí vzniklých granulí, jejich zeta potenciálu a indexu polydisperzity jsou včetně směrodatných odchylek uvedeny v Tab. 4.

Tab. 4: Průměrné hodnoty velikosti, indexu polydisperzity a zeta potenciálu umělé PHB granulí po odpařování rozpouštědla při všech teplotách po 20 minutách ultrasonifikace, resp. po odpařování rozpouštědla při 60 °C po 30 minutách ultrasonifikace

t_U (min)	T (°C)	d (nm)	\bar{D} (–)	ζ (mV)
20	50	$276,20 \pm 29,98$	$0,76 \pm 0,22$	$41,33 \pm 3,04$
		$827,50 \pm 154,30$		
	60	$430,90 \pm 10,11$	$0,40 \pm 0,08$	$56,95 \pm 1,06$
	70	$327,45 \pm 35,43$	$0,63 \pm 0,01$	$49,63 \pm 4,29$
	80	$257,60 \pm 23,00$	$0,60 \pm 0,08$	$57,20 \pm 2,26$
30	60	$284,30 \pm 4,00$	$0,20 \pm 0,01$	$61,80 \pm 1,93$

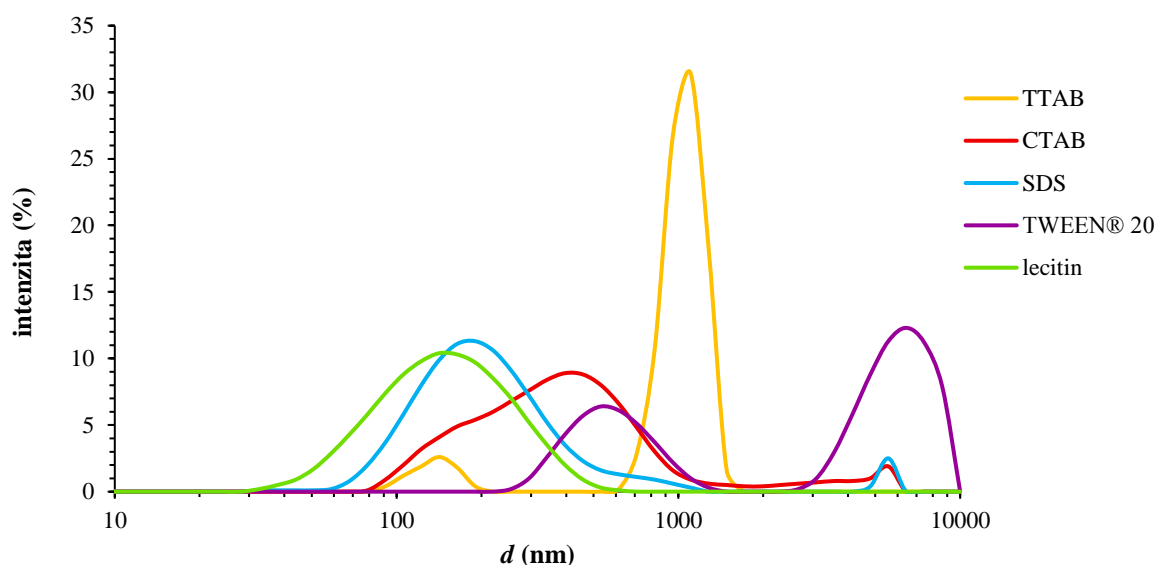
Víceméně podobných výsledků bylo dosaženo u vzorků umělé PHB granulí, z nichž byl chloroform odpařován po 30 minutách ultrazvukové lázně. Vzorek, z něhož se chloroform odpařoval při teplotě 50 °C, vykazoval vysokou polydisperzitu. Vzárovně s teplotou odpařování tohoto rozpouštědla o 10 °C se ale index polydisperzity výrazně snížil. Dalším nárůstem teploty odpařování chloroformu však polydisperzita opět značně vzrostla. To bylo pravděpodobně způsobeno jeho příliš rychlým odpařením, což mohlo narušit stabilizaci granulí, díky čemuž pak vznikly agregáty nebo naopak samostatné micely CTAB. Po odpaření chloroformu ze vzorků při laboratorní teplotě vznikaly granule větších rozměrů.

rů, přičemž vyšší polydisperzita byla zaznamenána jen u vzorků měřených po dvou dnech odpařování. Z hlediska zeta potenciálu byly všechny připravené vzorky opět stabilní.

S ohledem na získané distribuce, průměrné velikosti vytvořených PHB granulí a hodnoty indexů polydisperzity byla vybrána teplota 60 °C pro odpařování chloroformu jako nejvhodnější.

5.1.4 Studium vlivu povahy stabilizačních látek

Na základní sledované parametry připravených umělé PHB granulí měly výrazný vliv i jednotlivé použité stabilizační látky. Tato problematika byla studována u dvou sad vzorků, a to po 20 a 30 minutách působení ultrazvukové lázně. Pouze v případě granulí stabilizovaných lecitinem byla dispergace provedena pomocí ponorného ultrasonifikátoru po dobu pouhé jedné minuty. V hlavní části práce jsou uvedeny distribuce velikosti umělých granulí stabilizovaných použitými tensidy po 20 minutách ultrasonifikace a lecitinem. Distribuce velikosti umělých granulí po 30 minutách ultrasonifikace se nacházejí v přílohách (viz kap. 9).



Obr. 13: Srovnání distribucí velikosti umělých PHB granulí stabilizovaných tensidy po 20 minutách ultrasonifikace s distribucí velikosti umělých PHB granulí stabilizovaných lecitinem (hodnoty velikostí jsou na vodorovné ose uvedeny v logaritmickém měřítku)

Z distribucí znázorněných na Obr. 13 je zřejmé, že největších velikostí dosahovaly granule stabilizované tensidem TWEEN® a TTAB. Naopak mnohem účinněji se vytvořily po stabilizaci lecitinem nebo CTAB, přičemž tyto vykazovaly i nízkou polydisperzitu. Malé velikosti granulí bylo dosaženo také po jejich stabilizaci SDS, ale jejich polydisperzita společně s polydisperzitou granulí stabilizovaných TTAB byla ze všech vzorků nejvyšší. Podobné výsledky byly získány i u umělých granulí stabilizovaných týmiž tensidy po 30 minutách ultrasonifikace. V případě stabilizace pomocí TWEEN® 20 byl tento tensid v obou vzorcích ve velkém nadbytku, a proto množství jeho samotných micel značně převyšovalo počet granulí. V distribuci se to projevilo vznikem velmi intenzivního píku kolem 10 nm, čímž byly téměř zcela zastíněny píky odpovídající velikosti umělých granulí. Z toho důvodu byl pík příslušející těmto micelám vyloučen a distribuce byla posléze přepočítána.

Vůči agregaci byly v obou případech stabilní granule stabilizované TTAB, CTAB a SDS, přičemž nejvyšší stabilitu vykazovaly vždy granule stabilizované CTAB. Znaménko zeta potenciálu je dáno kationaktivní resp. anionaktivní povahou použitého tenzidu. U vzorků granulí stabilizovaných neionogenním tenzidem TWEEN® 20 byl naměřen zeta potenciál blízký nule, což vypovídá o elektrostatické nestabilitě těchto vzorků. Tendenci ke shlukování vzniklých umělých PHB granulí lze předpokládat i v případě stabilizace lecitinem. Průměrné hodnoty velikostí granulí, jejich zeta potenciálu a indexu polydisperzity jsou včetně směrodatných odchylek uvedeny v Tab. 5.

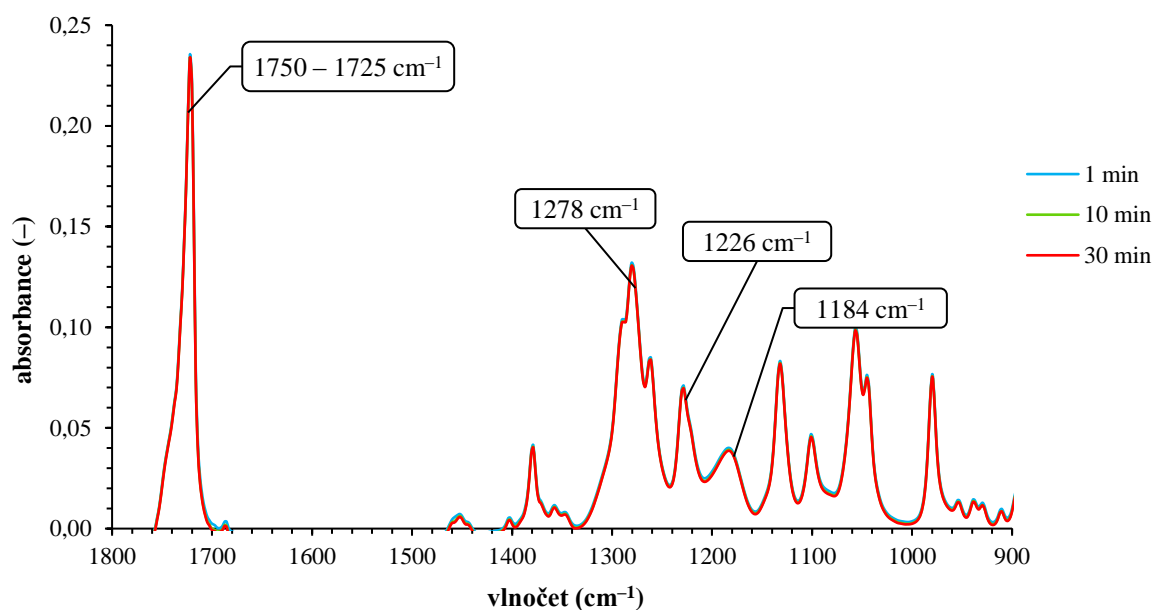
Jako nejvhodnější stabilizační látky byly na základě získaných distribucí velikosti vzniklých umělých PHB granulí a indexů polydisperzity určeny CTAB a lecitin.

Tab. 5: Průměrné hodnoty velikosti, indexu polydisperzity a zeta potenciálu umělých PHB granulí stabilizovaných různými tenzidy a lecitinem

t_U (min)	stabilizační látko	d (nm)	\bar{D} (–)	ζ (mV)
20	TTAB	$1\,057,00 \pm 165,60$ $137,00 \pm 24,35$	$0,88 \pm 0,05$	$40,43 \pm 0,15$
	CTAB	$430,90 \pm 10,11$	$0,40 \pm 0,08$	$56,95 \pm 1,06$
	SDS	$254,15 \pm 21,71$	$0,50 \pm 0,18$	$-53,70 \pm 1,13$
	TWEEN® 20	$6\,084,00 \pm 90,39$ $596,00 \pm 58,94$	$0,22 \pm 0,02$	$-10,45 \pm 0,83$
30	TTAB	$2\,235,00 \pm 43,13$ $294,80 \pm 54,94$	$0,58 \pm 0,04$	$42,70 \pm 1,04$
	CTAB	$284,30 \pm 4,00$	$0,20 \pm 0,01$	$61,80 \pm 1,93$
	SDS	$219,20 \pm 6,20$ $1\,663,00 \pm 79,20$	$0,65 \pm 0,06$	$-41,67 \pm 1,85$
	TWEEN® 20	$7\,705,00 \pm 935,30$ $414,90 \pm 90,25$	$0,35 \pm 0,05$	$-2,32 \pm 0,81$
1	lecitin	$166,00 \pm 2,40$	$0,22 \pm 0,00$	$-23,33 \pm 1,57$

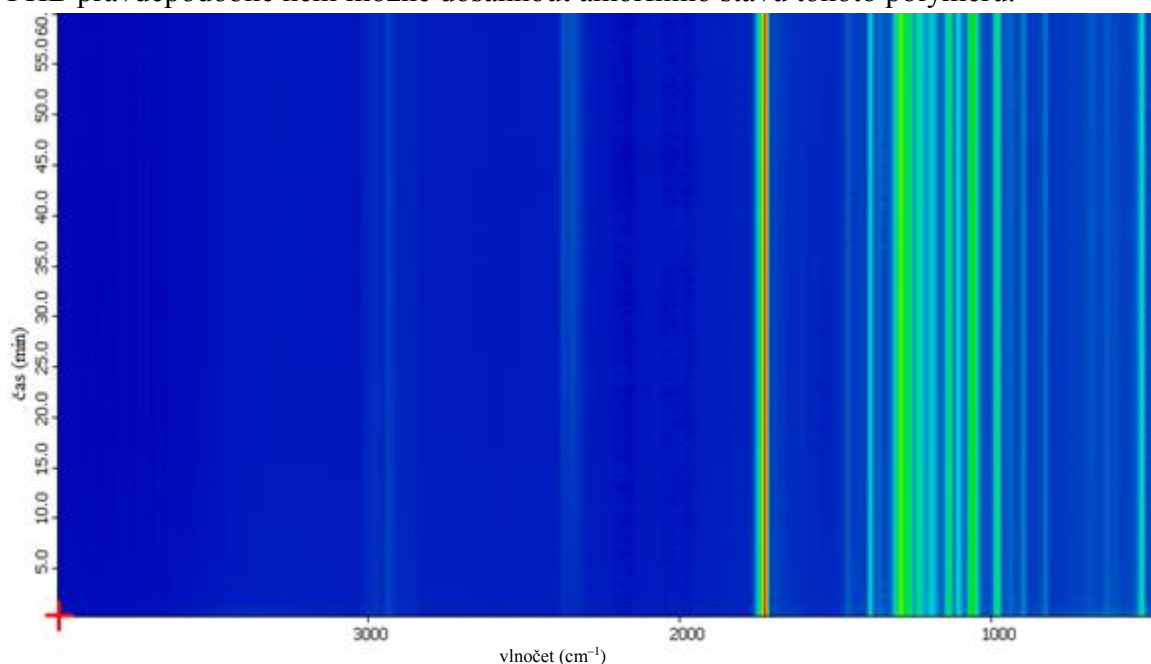
5.1.5 Charakterizace umělých lecitinových PHB granulí

Pro sledování krystalinity PHB uvnitř umělých granulí byly vybrány vzorky stabilizované lecitinem. Pomocí metody ATR-FTIR byla po dobu 60 minut zaznamenávána infračervená spektra těchto granulí s tím, jak postupně vlhký vzorek vysychal. Pro srovnání změn krystalinity polymeru v průběhu vysychání umělých granulí byla vybrána spektra naměřená po 1 minutě, 10 minutách a 30 minutách analýzy (viz Obr. 14).



Obr. 14: Infračervené spektrum umělého lecitinu PHB granulí zaznamenané po 1 minutě, 10 minutách a 30 minutách analýzy

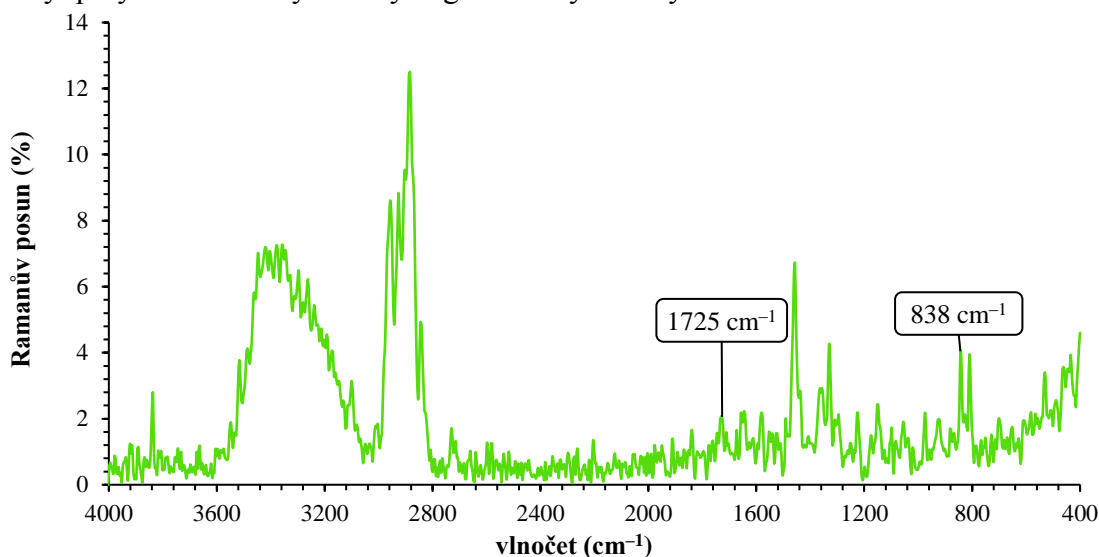
Intenzivní pík v rozmezí 1 750 až 1 725 cm^{-1} odpovídá vibracím esterových skupin vyskytujících se v polymeru. Píky při 1 278 a 1 226 cm^{-1} představují vibrace krystalické fáze polymeru, zatímco pík při 1 184 cm^{-1} představuje vibrace amorfni fáze polymeru [59]. Z tohoto obrázku je zřejmé, že se spektra v jednotlivých časech víceméně překrývají. To znamená, že se PHB uvnitř umělých granulí od samotného počátku analýzy nacházel téměř výhradně v krystalickém stavu a jeho krystalinita se v čase takřka vůbec neměnila. Tento fakt by mohl vypovídat o tom, že přípravou umělých granulí z krystalického PHB pravděpodobně není možné dosáhnout amorfniho stavu tohoto polymeru.



Obr. 15: Znáznornění změn infračervených spekter umělého lecitinu PHB granulí v průběhu analýzy

Výše uvedený obrázek je jiným možným výstupem analýzy umělého lecitinového PHB granulí pomocí ATR-FTIR. Jedná se o záznam změn hodnot absorpce v infračerveném spektru v čase, přičemž tyto intenzitní změny jsou znázorněny změnou barvy. Modrá barva představuje pozadí (šum) a naopak červená znázorňuje pík s nejvyšší hodnotou absorpce v daném spektru. Na Obr. 15 červená čára kolem 1750 cm^{-1} odpovídá píku příslušícímu vibraci esterových skupin. Výraznější zelená čára by mohla znázorňovat píky při 1278 a 1226 cm^{-1} příslušící krystalické fázi polymeru. Barvy těchto čar se v čase nemění, čímž bylo potvrzeno, že během celé analýzy skutečně nedocházelo ke změně krystalinity polyesteru uvnitř umělých granulí.

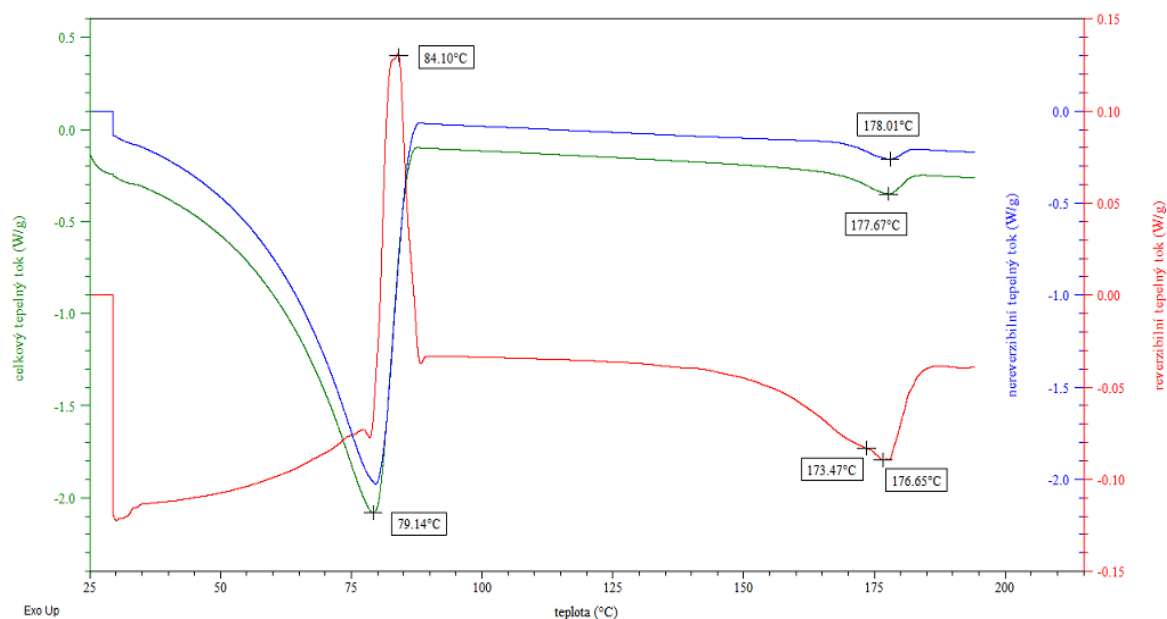
Pro ověření správnosti výsledků získaných metodou ATR-FTIR bylo dále změřeno Ramanovo spektrum umělých lecitinových PHB granulí, které je zobrazeno na Obr. 16. V Ramanově spektru odpovídá amorfnímu stavu PHB pás vibrace při 1736 cm^{-1} [58]. Jestliže se ale tento polymer do určité míry nachází v krystalickém stavu, dochází k posunu tohoto pásu vibrace směrem k nižším hodnotám vlnové délky, a to až o 15 cm^{-1} . Kromě toho je se změnou krystalinity PHB možné pozorovat i změnu polohy pásu vibrace vůči původní hodnotě vlnové délky při 841 cm^{-1} . V případě umělých lecitinových PHB granulí byly zaznamenány posuny k 1725 cm^{-1} , případně k 838 cm^{-1} . Tyto posuny jsou dokladem toho, že byl polymer uvnitř vytvořených granulí krystalický.



Obr. 16: Ramanovo spektrum umělých lecitinových PHB granulí

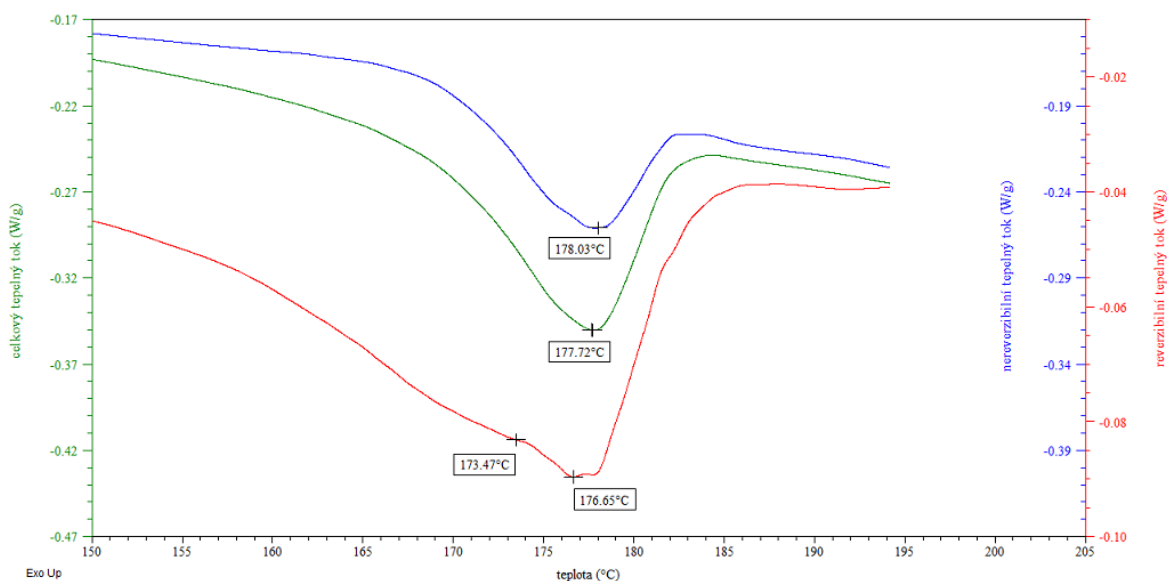
Pomocí TMDS byly studovány některé fyzikální vlastnosti PHB uvnitř umělých lecitinových granulí. Kromě toho byly také pozorovány změny celého vzorku během jeho zahřívání. Obr. 17 znázorňuje celý záznam TMDSC analýzy tohoto vzorku, tedy teplotní závislost celkového signálu tepelného toku včetně jeho rozdělení na reverzibilní a nereverzibilní složku, které jsou od sebe v termogramu odlišeny různými barvami křivek a os. U křivky odpovídající nereverzibilní složce signálu tepelného toku lze pozorovat endotermní pík v oblasti mezi 50 a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$, který odpovídá vypařování vody ze vzorku. U křivky odpovídající reverzibilní složce signálu tepelného toku je patrný naopak exotermní pík v oblasti mezi 80 a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tento pík by teoreticky mohl odpovídat probíhající krystalizaci PHB, protože se v termogramu nachází v oblasti teplot vypařování vody. Je však příliš výrazný na to, aby znázorňoval tento jev. Přesto se jedná o velice zajímavou oblast v celém

termogramu, na kterou je třeba se zaměřit v dalším výzkumu. V křivce celkového signálu tepelného toku tento pík na rozdíl od endotermního píku vypařování vody zcela chybí.



Obr. 17: Celý záznam TMDSC analýzy umělého lecitinových PHB granulí

Obr. 18 se v záznamu TMDSC analýzy zaměřuje na rozmezí teplot, ve kterém dochází k tání polymeru. U křivky odpovídající reverzibilní složce signálu tepelného toku lze rozpoznat dva endotermní píky. Pík při 173,47 °C by mohl znázorňovat buď jakési uvolnění napětí v polymeru, nebo druhou teplotu tání. Druhá uvedená možnost by naznačovala, že ve vzorku byly přítomny dvě různé krystalické formy polymeru. Tato záležitost proto jistě bude předmětem podrobnějšího studia v dalších pracích. Méně výrazný pík je vidět i u křivky odpovídající nereverzibilní složce signálu tepelného toku, avšak pro přehlednost termogramu do něj nebyl zaznačen. V křivce celkového signálu tepelného toku je patrný pouze jeden pík odpovídající jedné teplotě tání PHB, a to 177,72 °C.



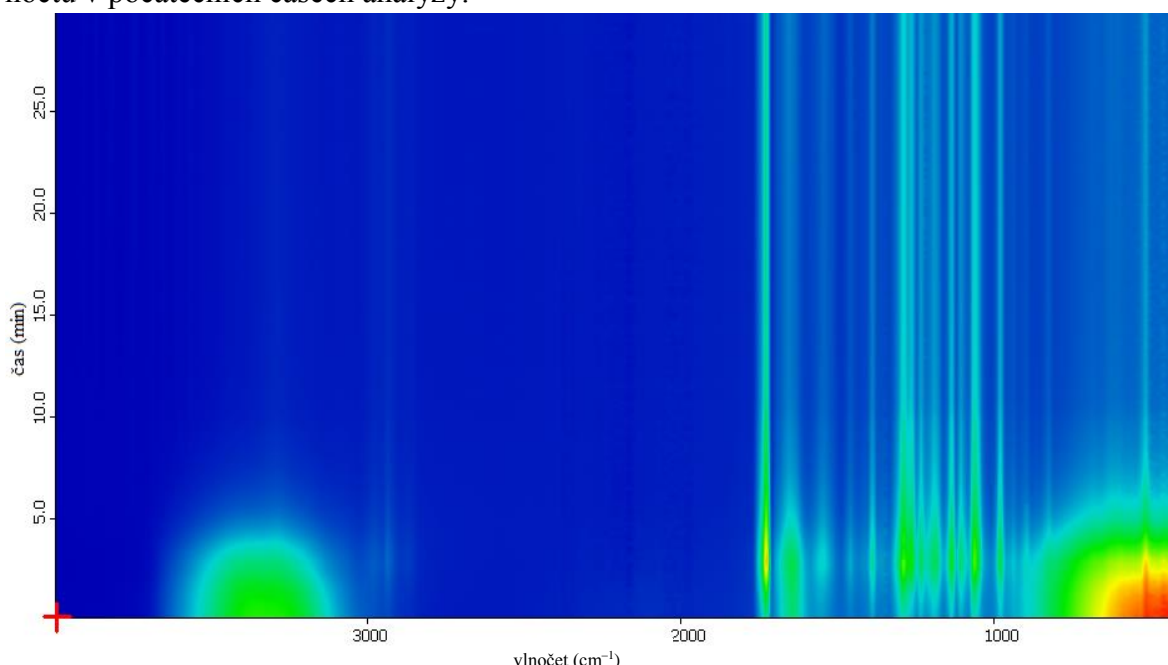
Obr. 18: Část záznamu TMDSC analýzy umělého lecitinových PHB granulí ve vybraném rozmezí teplot

5.2 Charakterizace nativních PHB granulí

Druhá část práce se zabývala nalezením vhodného postupu izolace nativních PHB granulí z bakteriálních buněk, aby polymer uvnitř granulí zůstal v co nejvíce amorfnní formě. Na základě literární rešerše byly zvoleny dvě izolační metody. První z nich byla založena na působení lysozymu, deoxyribonukleázy a mechanickém rozrušení buněk ultrazvukem. Druhý způsob spočíval v digesci bakterií s alkalázou, SDS a EDTA. Nativní granule izolované těmito dvěma postupy pak byly charakterizovány jednak z hlediska krystalinity a jednak technikami rozptylu světla za účelem pozorování jejich chování v koloidních systémech.

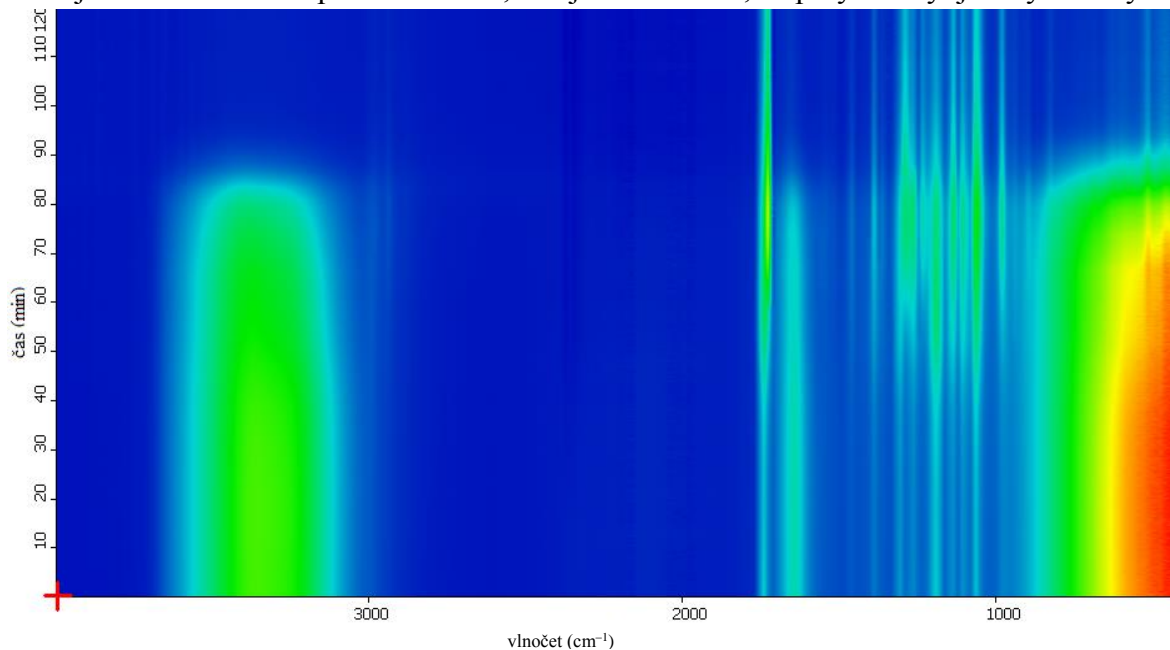
5.2.1 Infračervená spektroskopie

Pomocí metody ATR-FTIR byl po dobu 30 minut analyzován vzorek nativních PHB granulí izolovaných prvním způsobem (lysozym, deoxyribonukleáza, ultrazvuk) a po dobu 120 minut vzorek nativních PHB granulí izolovaných druhým způsobem (alkaláza, SDS). Obr. 19 znázorňuje záznam změn hodnot absorpance v infračerveném spektru v čase pro první vzorek. Nejprve je nutné si povšimnout zelené oblasti mezi $4\,000$ a $3\,000\text{ cm}^{-1}$ na počátku analýzy. Tato oblast popisuje, jak dlouho tento vzorek zadržoval vlhkost. V případě prvního vzorku se tedy jednalo o pouhé 3 až 4 minuty, po nichž došlo k jeho vysušení, které bylo doprovázeno krystalizací tím, jak nativní granule ztrácely vodu, která v nich působila jako plastifikátor. Tento jev lze pozorovat změnou barvy čar kolem $1\,750\text{ cm}^{-1}$, $1\,278\text{ cm}^{-1}$ a $1\,226\text{ cm}^{-1}$ přibližně v čase vysychání vzorku. Je ovšem možné, že se polymer v granulích nacházel do jisté míry v krystalickém stavu už na samotném počátku měření, což dokazuje zelená a zelenomodrá barva čar u příslušných hodnot vlnových v počátečních časech analýzy.



Obr. 19: Znáznornění změn infračervených spekter v průběhu analýzy nativních PHB granulí izolovaných pomocí lysozymu, deoxyribonukleázy a mechanického rozrušení buněk ultrazvukem

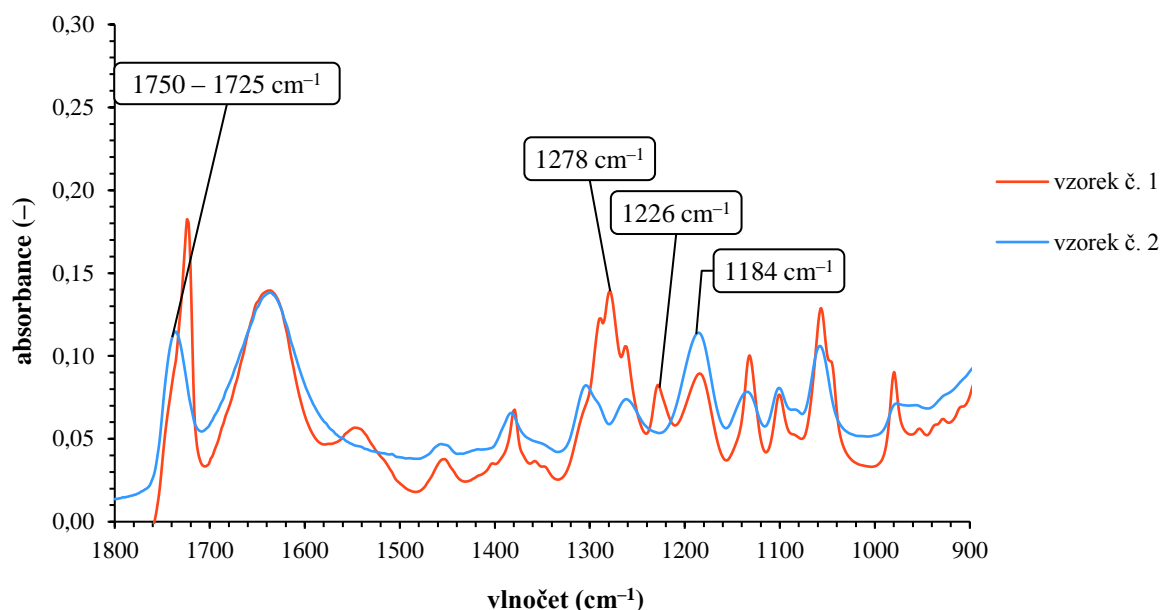
Obr. 20 znázorňuje záznam změn hodnot absorpance v infračerveném spektru v čase pro druhý vzorek. Oproti předchozímu případu tento vzorek zadržoval vlhkost mnohem déle (až 80 min). Z toho důvodu trvala jeho analýza 2 hodiny. Slabá intenzita světle modré barvy čar kolem $1\,278$ a $1\,226\text{ cm}^{-1}$ a zároveň silnější intenzita téže barvy čáry při $1\,184\text{ cm}^{-1}$ na počátku měření poukazuje na to, že se v tu dobu polymer uvnitř granulí vyskytoval do velké míry v amorfním stavu. Samotný proces krystalizace (změna barev příslušných čar z modré na zelenou) také probíhal delší dobu než u předchozího vzorku tím, jak se vzorek pomaleji zbavoval vody. Ke konci měření byly modré čáry při $1\,278$ a $1\,226\text{ cm}^{-1}$ intenzivnější než modrá čára při $1\,184\text{ cm}^{-1}$, což je důkaz toho, že polymer byl již krystalický.



Obr. 20: Znázornění změn infračervených spekter v průběhu analýzy nativních PHB granulí izolovaných pomocí alkalázy a SDS

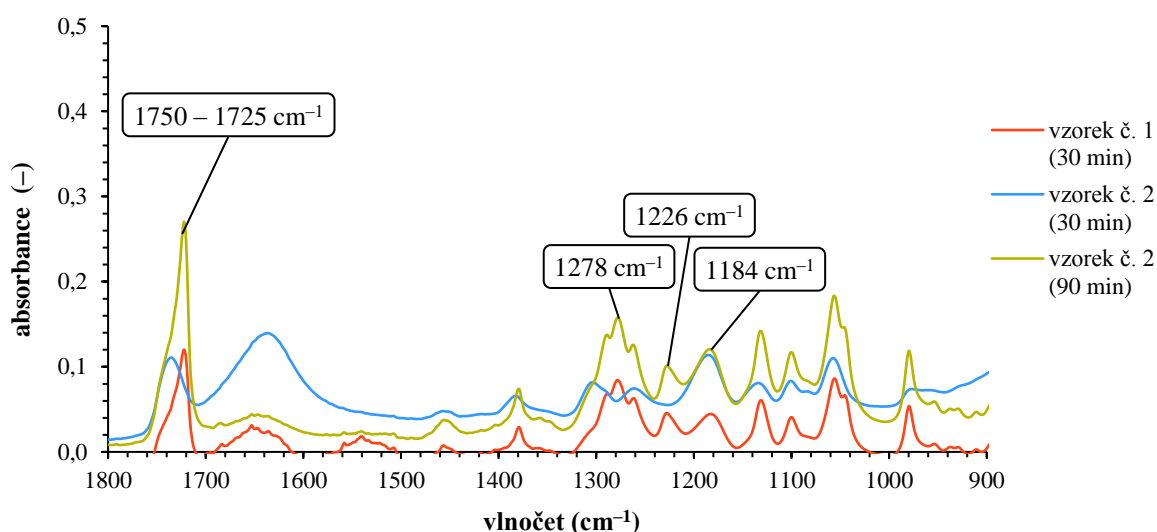
Na základě těchto obrázků byla dále vybrána infračervená spektra změřená po 1 minutě, 10 minutách a 30 minutách (popř. 90 minutách) analýzy. V hlavní části práce jsou pro přehlednost uvedena pouze spektra s vybraným rozmezím vlnočtů změřená po 1 minutě a 30 minutách (popř. 90 minutách) analýzy obou vzorků. Celá spektra v uvedených časech analýzy lze nalézt v přílohách (viz kap. 9).

Na Obr. 21 jsou porovnávána infračervená spektra získaná po 1 minutě analýzy obou vzorků nativních PHB granulí. Ve spektru prvního vzorku jsou viditelné píky při $1\,278$ a $1\,226\text{ cm}^{-1}$ odpovídající vibracím krystalické fáze polymeru, zatímco ve spektru druhého vzorku tyto píky chybí. Naopak pík při $1\,184\text{ cm}^{-1}$ příslušející vibracím amorfní fáze polymeru je intenzivnější ve spektru druhého vzorku než v případě spektra prvního vzorku. Z těchto spekter lze tedy vyčíst, že PHB uvnitř nativních granulí izolovaných druhou metodou se na počátku měření vyskytoval v amorfním stavu, zatímco PHB uvnitř nativních granulí izolovaných první metodou byl již do jisté míry krystalický. To je potvrzeno i celkovou symetrií píku odpovídajícího vibracím esterových skupin v rozmezí $1\,750$ až $1\,725\text{ cm}^{-1}$, kdy v případě amorfního stavu polymeru je tento pík víceméně symetrický a v případě krystalického stavu polymeru je nakloněn na stranu směrem k nižším hodnotám vlnočtu.



Obr. 21: Srovnání infračervených spekter zaznamenaných po 1 minutě analýzy nativních PHB granulí izolovaných pomocí lysozymu, deoxyribonukleázy a mechanického rozrušení buněk ultrazvukem (vzorek č. 1) a pomocí alkalázy a SDS (vzorek č. 2)

Na Obr. 22 jsou porovnána infračervená spektra získaná po 30 minutách analýzy obou vzorků a spektrum získané po 90 minutách analýzy vzorku č. 2. Zatímco první vzorek byl po půl hodině měření již zcela vysušen, druhý vzorek si stále udržoval svou původní vlhkost. Díky tomu byl PHB v prvním vzorku zcela krystalický, a naopak PHB uvnitř granulí druhého vzorku se zatím pořád nacházel v amorfním stavu, neboť v jeho spektru stále nebyly zaznamenány píky příslušející krystalické fázi tohoto polymeru. Ty bylo možné pozorovat až ve spektru získaném po 90 minutách analýzy tohoto vzorku, který byl po této době již do značné míry vysušen. Stejně tak došlo k náklonu píku odpovídajícího vibračním esterových skupin na stranu směrem k nižším hodnotám vlnočtu.



Obr. 22: Srovnání infračervených spekter zaznamenaných po 30 minutách (popř. 90 min) analýzy nativních PHB granulí izolovaných pomocí lysozymu, deoxyribonukleázy a mechanického rozrušení buněk ultrazvukem (vzorek č. 1) a pomocí alkalázy a SDS (vzorek č. 2)

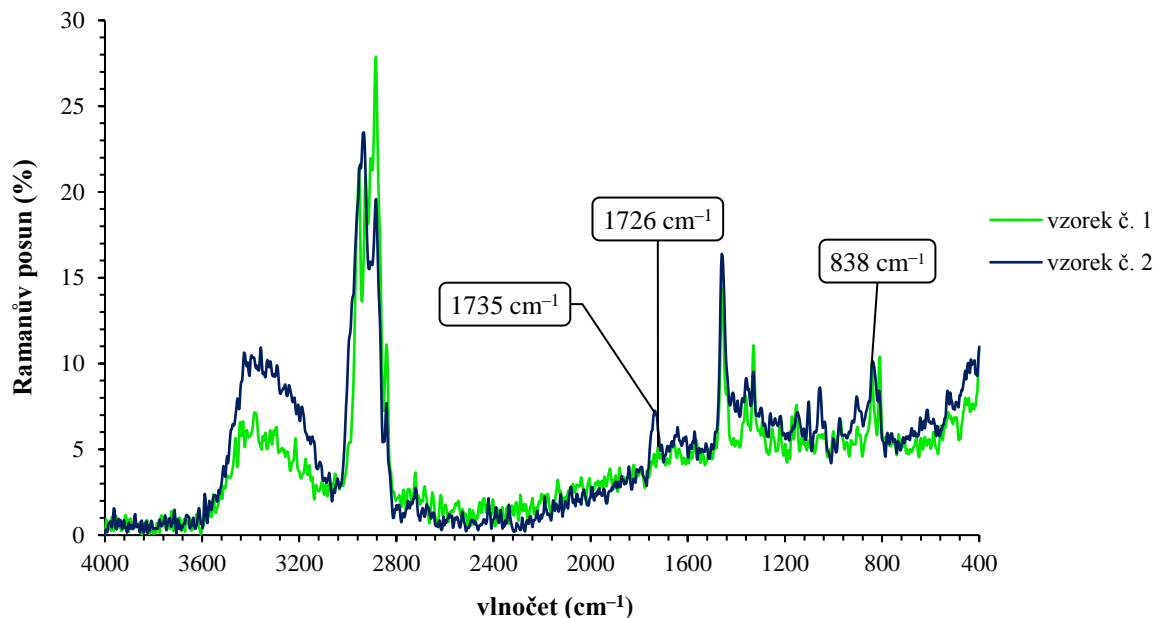
Jelikož je intenzita sledovaných píků v jednotlivých spektrech odlišná, musela být míra krystalizace PHB u obou vzorků ve všech vybraných časech analýzy zjištěna pomocí indexu krystalinity [59]. Ten byl vypočítán podělením hodnot absorbancí píků při $1\,278\text{ cm}^{-1}$ a při $1\,184\text{ cm}^{-1}$. Jeho hodnoty jsou s příslušnou dobou analýzy pro každý vzorek uvedeny v Tab. 6. Na základě těchto hodnot lze jasně stanovit, že nejméně krystalický byl PHB ve druhém vzorku první půl hodinu analýzy, přičemž po 90 minutách jeho krystalinita značně vzrostla. U prvního vzorku byla míra krystalizace PHB vyšší od samotného začátku měření a v průběhu analýzy se ještě postupně zvyšovala.

Tab. 6: Hodnoty indexu krystalinity PHB u obou vzorků nativních granulí ve vybraných časech analýzy

číslo vzorku	doba analýzy (min)	index krystalinity (–)
1	1	1,56
	10	1,67
	30	2,00
2	1	0,55
	10	0,55
	30	0,55
	90	1,33

5.2.2 Ramanova spektroskopie

Pro potvrzení výsledků z analýzy ATR-FTIR byla dále změřena Ramanova spektra obou vzorků nativních PHB granulí. Tato spektra jsou porovnána na Obr. 23.

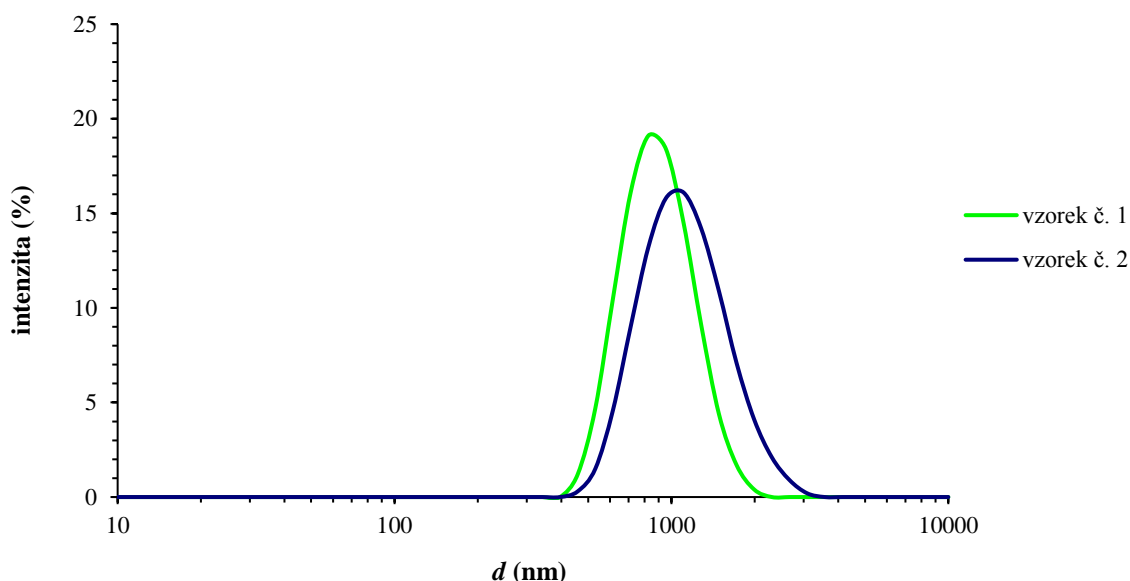


Obr. 23: Srovnání Ramanových spekter nativních granulí izolovaných pomocí lysozymu, deoxyribonukleázy a mechanického rozrušení buněk ultrazvukem (vzorek č. 1) a pomocí alkalázy a SDS (vzorek č. 2)

Výraznější rozdíl lze nalézt pouze v případě posunu pásu vibrace při 1736 cm^{-1} . V Ramanově spektru druhého vzorku byla zaznamenána maximální intenzita píku při 1735 cm^{-1} a v Ramanově spektru druhého vzorku při 1726 cm^{-1} , přičemž tento pík byl mnohem méně intenzivní. Tento posun svědčí o tom, že polymer uvnitř nativních granulí izolovaných prvním způsobem se v krystalickém stavu nacházel ve větší míře než polymer uvnitř nativních granulí izolovaných druhým způsobem. V obou spektrech si lze rovněž povšimnout nepatrné změny polohy pásu vibrace vůči původní hodnotě vlnočtu při 841 cm^{-1} , avšak rozdíly mezi těmito posuny v obou spektrech nebyly pozorovány.

5.2.3 Rozptyl světla

Pomocí dynamického rozptylu světla byly získány distribuce velikosti nativních PHB granulí izolovaných oběma způsoby.



Obr. 24: Srovnání distribucí velikosti nativních PHB granulí izolovaných pomocí lysozymu, deoxyribonukleázy a mechanického rozrušení buněk ultrazvukem (vzorek č. 1) a pomocí alkalázy a SDS (vzorek č. 2) – hodnoty velikostí jsou na vodorovné ose uvedeny v logaritmickém měřítku

Distribuce znázorněné na Obr. 24 vypovídají o tom, že PHB granule izolované pomocí lysozymu, deoxyribonukleázy a ultrazvuku měly menší velikost než PHB granule izolované pomocí alkalázy a SDS. Větší změřený rozměr granulí izolovaných druhým zmíněným způsobem může být dán přítomností SDS, který snížil jejich povrchové napětí, díky čemuž se granule shlukly do větších celků. Oba vzorky také vykazovaly nízkou polydisperzitu.

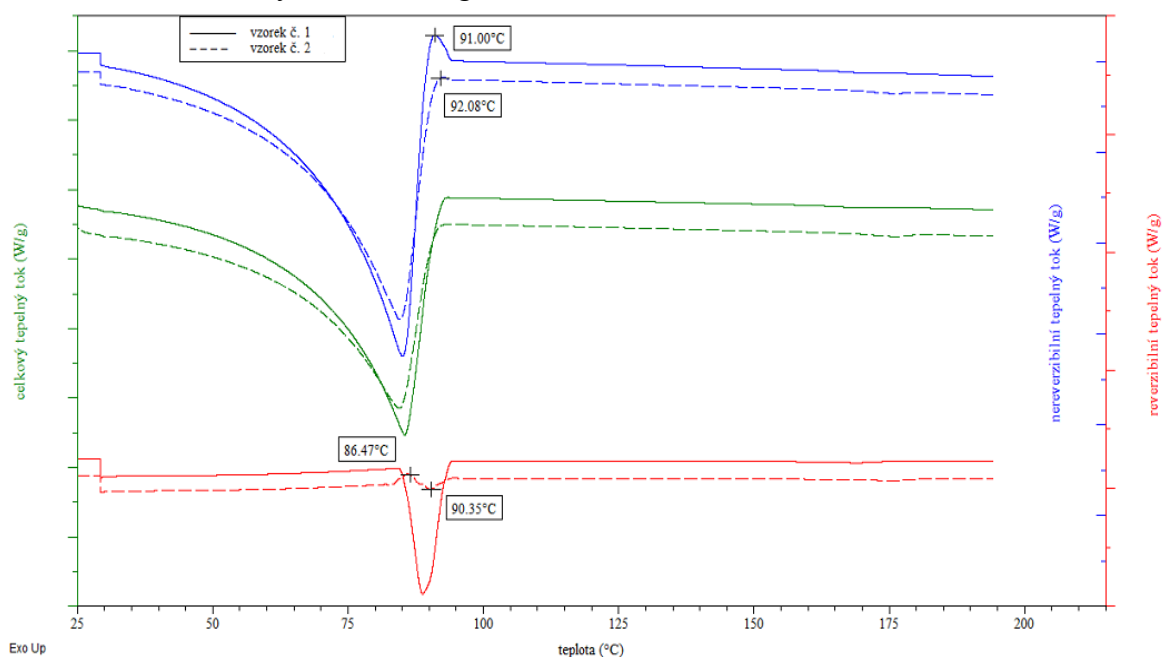
Z hlediska zeta potenciálu byly oba vzorky nestabilní. Zápornější hodnota zeta potenciálu u vzorku č. 2 by mohla potvrzovat přítomnost SDS v povrchové vrstvě izolovaných PHB granulí. Průměrné hodnoty velikostí granulí, jejich zeta potenciálu a indexu polydisperzity jsou včetně směrodatných odchylek uvedeny v Tab. 7.

Tab. 7: Průměrné hodnoty velikosti, indexu polydisperzity a zeta potenciálu nativních PHB granulí izolovaných pomocí lysozymu, deoxyribonukleázy a mechanického rozrušení buněk ultrazvukem (vzorek č. 1) a pomocí alkalázy a SDS (vzorek č. 2)

číslo vzorku	d (nm)	\bar{D} (–)	ζ (mV)
1	$922,11 \pm 11,03$	$0,11 \pm 0,02$	$-3,08 \pm 1,29$
2	$1\,210,00 \pm 12,73$	$0,12 \pm 0,01$	$-14,10 \pm 2,55$

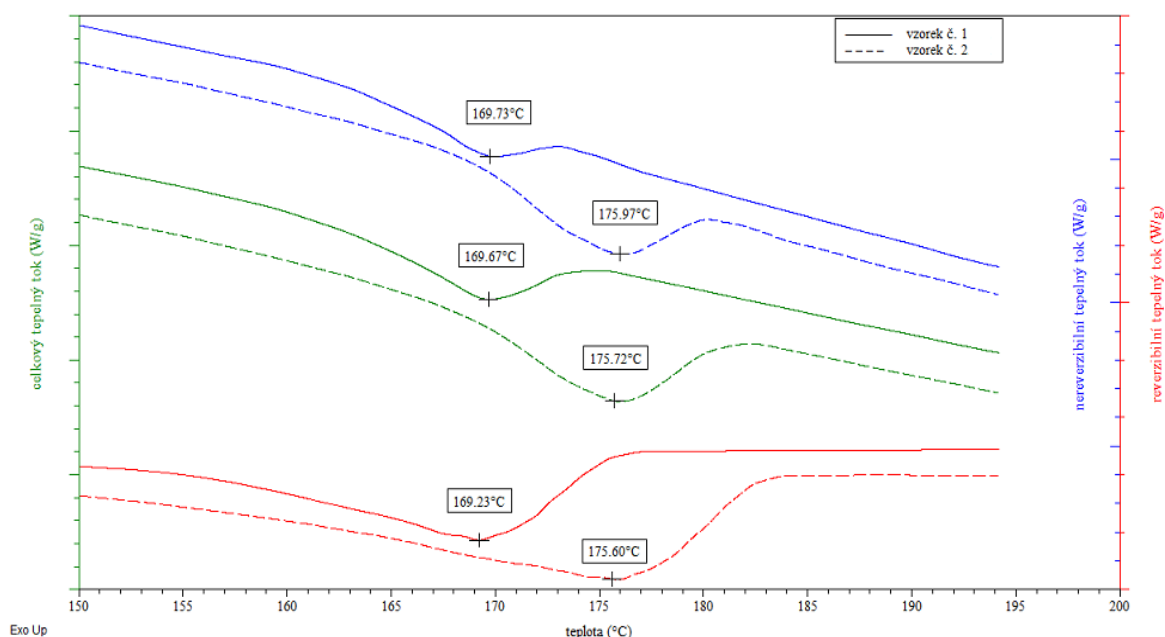
5.2.4 Teplotně modulovaná diferenční kompenzační kalorimetrie

Pro studium některých fyzikálních vlastností PHB byla provedena TMDSC analýza obou vzorků izolovaných nativních granulí.



Obr. 25: Srovnání celých záznamů TMDSC analýzy nativních PHB granulí izolovaných pomocí lysozymu, deoxyribonukleázy a mechanického rozrušení buněk ultrazvukem (vzorek č. 1) a pomocí alkalázy a SDS (vzorek č. 2) – jeden dílek na svislé ose odpovídá polovině jednotky tepelného toku

Na Obr. 25 je zobrazen celý záznam TMDSC analýzy obou vzorků nativních PHB granulí. Jedná se o jednotlivé teplotní závislosti celkového signálu tepelného toku včetně jeho rozdělení na reverzibilní a nereverzibilní složku, které jsou od sebe v termogramu odlišeny různými barvami křivek a os. Z výskytu endotermních píků u křivky odpovídající celkovému signálu tepelného toku a jeho nereverzibilní složce je patrné, že v oblasti mezi 60 a 90 °C docházelo k vypařování vody ze vzorku. U obou vzorků je v případě křivky pro nereverzibilní složku tepelného toku přítomen nepatrný exotermní pík po ukončení procesu vypařování vody, a to při 91 °C, resp. při 92,08 °C. Tento pík by teoreticky mohl odpovídat krystalizaci PHB, která proběhla po odpaření vody ze vzorku. U křivky odpovídající reverzibilní složce tepelného toku pro vzorek č. 2 se ale přibližně při stejné teplotě vyskytuje slabý endotermní pík, kterému předchází stejně intenzivní exotermní pík, což by mohlo zpochybnit předchozí domněnku. Z toho důvodu je nutné věnovat se problematice tohoto jevu podrobněji v dalším výzkumu.



Obr. 26: Srovnání částí záznamu TMDSC analýzy nativních PHB granulí izolovaných pomocí lysozymu, deoxyribonukleázy a mechanického rozrušení buněk ultrazvukem (vzorek č. 1) a pomocí alkalázy a SDS (vzorek č. 2) ve vybraném rozmezí teplot – jeden dílek na svislé ose odpovídá setině jednotky tepelného toku

Obr. 26 znázorňuje změny tepelného toku v rozmezí teplot TMDSC analýzy, v němž dochází k tání polymeru. V křivkách příslušejících reverzibilní nebo nereverzibilní složce signálu tepelného toku pro oba vzorky je patrný vždy pouze jeden pík odpovídající jedné teplotě tání PHB. Obě složky pak přispívají podobnou měrou celkovému signálu tepelného toku. Na základě teplot tání stanovených v tomto obrázku lze tedy jasně říci, že PHB v granulích izolovaných pomocí alkalázy a SDS je teplotně stabilnější než PHB v granulích izolovaných pomocí lysozymu deoxyribonukleázy a mechanického rozrušení buněk ultrazvukem.

5.3 Charakterizace upravených nativních PHB granulí

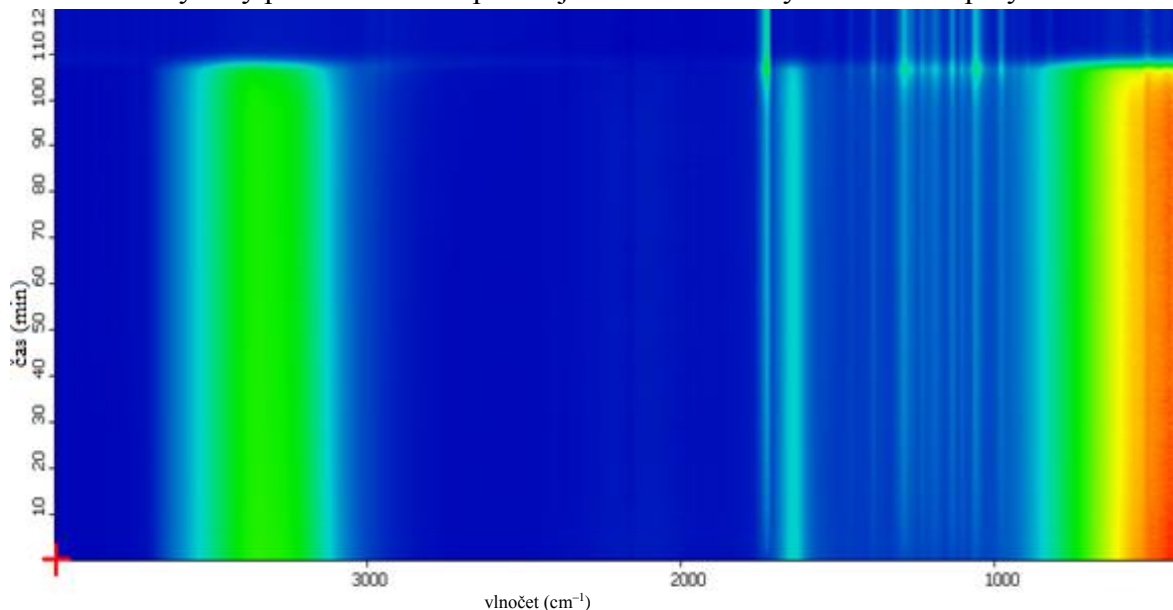
V poslední části práce byly sledovány vlivy působení různých činidel na míru krystalizace polymeru uvnitř izolovaných granulí. Jako činidlo byl za těmito účely zvolen aceton, který působí dehydratačním účinkem, dále lipáza, která štěpí lipidy z povrchové vrstvy granulí, a chlornan sodný, odstraňující proteiny a lipidy z povrchové vrstvy granulí svým vysokým pH. Tyto látky by měly svým působením v různé míře vyvolat krystalizaci PHB.

Takto upravené PHB granule byly charakterizovány pouze pomocí ATR-FTIR a technik rozptylu světla. U výsledků z Ramanovy spektroskopie či TMDSC by totiž změny spojené s úpravou granulí pravděpodobně nebyly pozorovatelné.

5.3.1 Infračervená spektroskopie

Pro analýzu pomocí ATR-FTIR byly výše uvedenými činidly upraveny pouze granule izolované pomocí alkalázy a SDS, poněvadž v nich polymer zůstal víceméně amorfni. Změny jeho krystalinity by tudíž mělo být snazší detekovat než v případě částečně krystalického PHB v granulích izolovaných prvním způsobem. Všechny upravené vzorky byly analyzovány 120 minut.

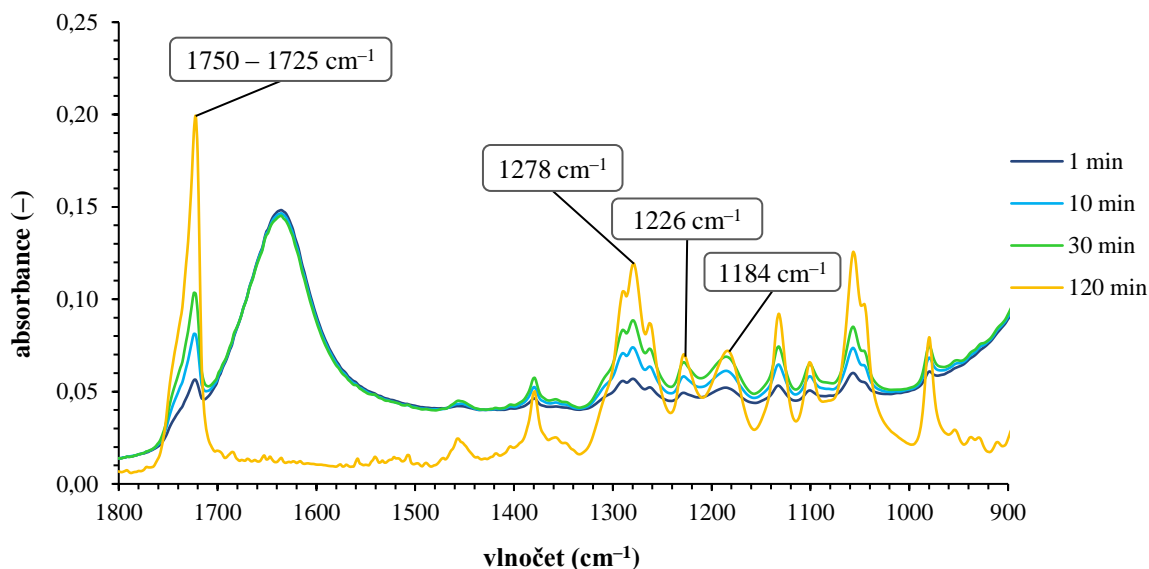
Obr. 27 znázorňuje záznam změn hodnot absorpance v infračerveném spektru v čase pro vzorek nativních PHB granulí upravených chlornanem sodným. Je z něj patrné, že vzorek zadržoval vlhkost necelých 110 minut, což je dokonce ještě déle než v případě neošetřených PHB granulí. Tím, jak byl signál zkreslen přítomností vody, proto ani nelze řádně porovnat intenzitu světle modré barvy čar kolem $1\,278\text{ cm}^{-1}$, $1\,226\text{ cm}^{-1}$ a $1\,184\text{ cm}^{-1}$. Po jejich důkladnějším prohlédnutí je ale možné říci, že jejich intenzita kolem $1\,278$ a $1\,226\text{ cm}^{-1}$ je nepatrně vyšší než při $1\,184\text{ cm}^{-1}$. Od počátku vysoušení vzorku byly rozdíly mezi intenzitami barev jednotlivých čar snáze rozpoznatelné, přičemž vyšší intenzitu měly čáry při vlnótech odpovídajícím vibracím krystalické fáze polymeru.



Obr. 27: Znázornění změn infračervených spekter v průběhu analýzy nativních PHB granulí upravených chlornanem sodným

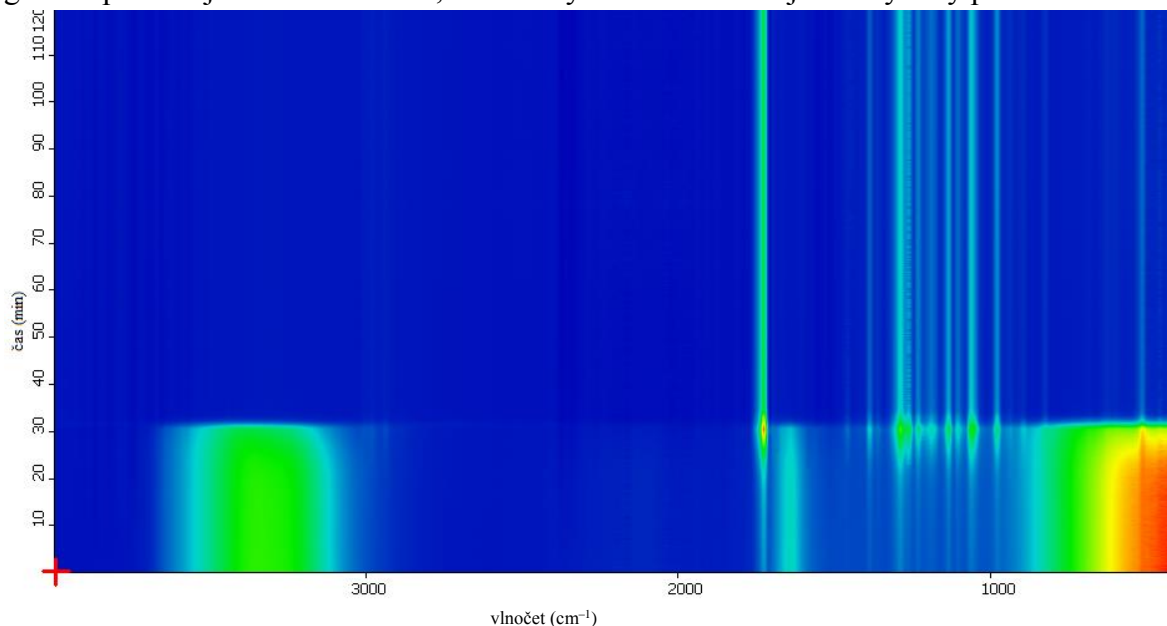
Pro důkladnější rozbor výsledků ATR-FTIR analýzy tohoto vzorku byla dále vybrána infračervená spektra změřená po 1 minutě, 10 minutách, 30 minutách a 120 minutách. V hlavní části práce jsou pro přehlednost uvedena pouze spektra s vybraným rozmezím vlnóťů. Celá spektra lze nalézt v přílohách (viz kap. 9).

Na Obr. 28 lze pozorovat změny jednotlivých spekter v průběhu vysoušení vzorku během analýzy. Spektra změřená po 1 minutě, 10 minutách a 30 minutách analýzy jsou výrazně zkreslena přítomností vody. To se projevilo jednak vyššími hodnotami absorbancí základních linií těchto spekter a jednak minimálním rozdílem intenzit píků při vlnótech $1\,278\text{ cm}^{-1}$, $1\,226\text{ cm}^{-1}$ a $1\,184\text{ cm}^{-1}$. Pík při $1\,278\text{ cm}^{-1}$ je nicméně vždy intenzivnější než pík při $1\,184\text{ cm}^{-1}$, přičemž tento intenzitní rozdíl se v průběhu analýzy zvětšuje. Na konci měření byl vzorek již zcela vysušen, a proto ve spektru došlo k poklesu hodnot absorpance základní linie, a zároveň ke zintenzivnění rozdílu mezi sledovanými píky. Pík při $1\,278\text{ cm}^{-1}$ měl vyšší intenzitu než pík při $1\,184\text{ cm}^{-1}$, z čehož vyplývá vysoká míra krystalizace PHB. Asymetričnost píku v oblasti mezi $1\,750$ a $1\,725\text{ cm}^{-1}$ zaznamenaná ve všech spektrech naznačuje, že polymer uvnitř upravených granulí byl krystalický už od samotného počátku analýzy.



Obr. 28: Srovnání infračervených spekter zaznamenaných ve vybraných časech analýzy nativních PHB granulí upravených chlornanem sodným

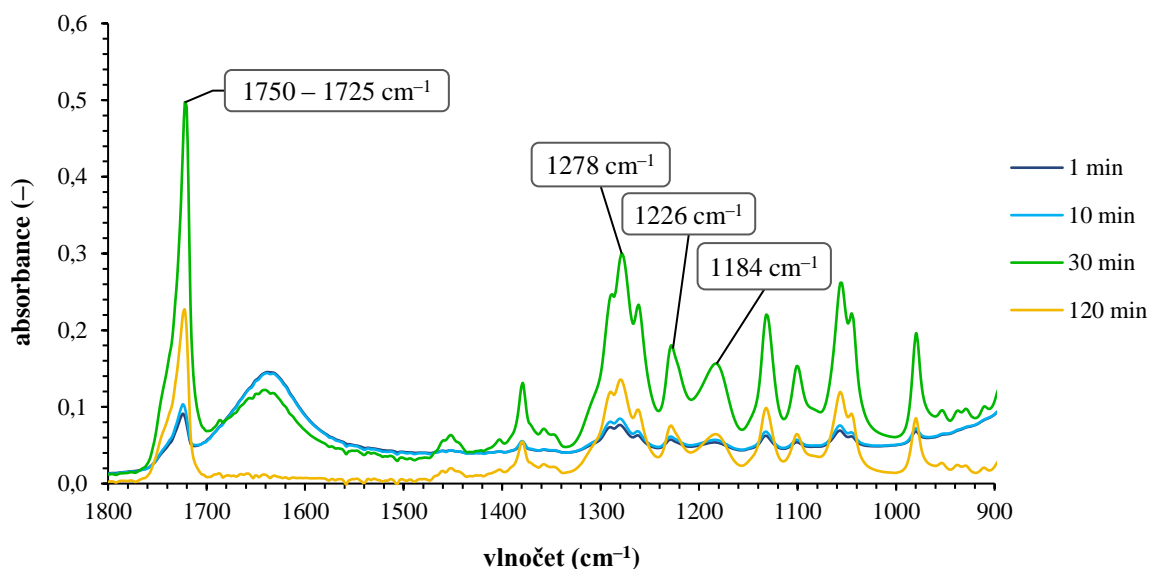
Obr. 29 znázorňuje záznam změn hodnot absorbance v infračerveném spektru v čase pro vzorek nativních PHB granulí upravených lipázou. Lze z něj vyčíst, že vzorek zadržoval vodu zhruba 30 minut. Stejně jako v předchozím případě přítomnost vody do určité míry signál zkreslovala, avšak rozdíl intenzit světle modré barvy čar při pozorovaných hodnotách vlnočtů byl již rozpoznatelný. Čára při vlnočtu o hodnotě 1278 cm^{-1} je už na počátku analýzy intenzivnější než čára v oblasti kolem 1184 cm^{-1} . Z toho plyne, že vysoká míra krystalizace PHB byla zaznamenána i přes to, že byl signál zkreslen vysokou vlhkostí vzorku. Samotný proces vysušení vzorku (dočasná změna barev příslušných čar ze světle modré na zelenou) proběhl poměrně rychle. Krystalinita polymeru uvnitř upravených granulí po něm ještě více vzrostla, což lze vyčíst z intenzivnější barvy čáry při 1278 cm^{-1} .



Obr. 29: Znáznornění změn infračervených spekter v průběhu analýzy nativních PHB granulí upravených lipázou

Dále byla pro názornost vybrána infračervená spektra změřená po 1 minutě, 10 minutách, 30 minutách a 120 minutách. V hlavní části práce jsou pro přehlednost uvedena pouze spektra s vybraným rozmezím vlnočtů. Celá spektra lze nalézt v přílohách (viz kap. 9).

Infračervená spektra na Obr. 30 potvrzují výše uvedený komentář k předchozímu obrázku. Spektra změřená po 1 minutě a 10 minutách analýzy jsou výrazně zkreslena přítomností vody. Sice v nich lze rozeznat pík při $1\,278\text{ cm}^{-1}$, ale pík při $1\,184\text{ cm}^{-1}$ je od jejich základní linie takřka nerozlišitelný. Přesto by tento intenzitní rozdíl mohl vypovídat o tom, že polymer uvnitř granulí byl již v této fázi analýzy krystalický. Po 30 minutách měření, kdy ve vzorku začalo docházet k úbytku vody, se ve spektru výrazněji projeví rozdíly intenzit píků příslušejících vibracím krystalické, resp. amorfni fázi PHB. Na konci měření byl vzorek již zcela vysušen, a proto ve spektru došlo k poklesu hodnot absorpance základní linie, a zároveň i intenzity sledovaných píků. Jejich intenzita byla menší jednoduše proto, že v ní nebyl obsažen signál odpovídající přítomnosti vody. Krystalický stav PHB uvnitř upravených granulí je opět potvrzen přítomností asymetrického píku v rozmezí $1\,750$ až $1\,725\text{ cm}^{-1}$ ve všech spektrech.



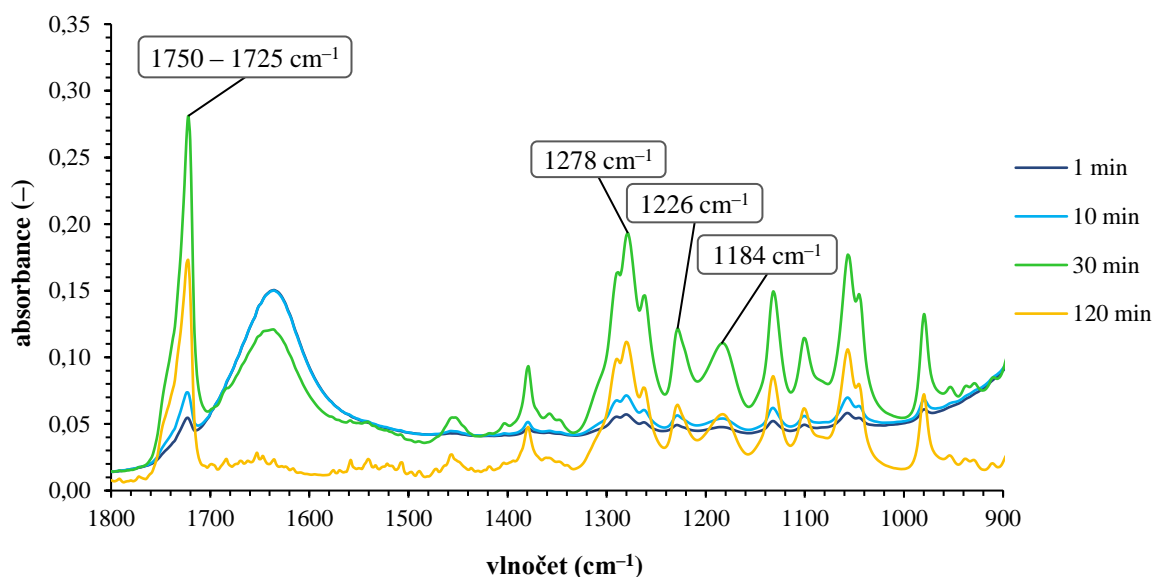
Obr. 30: Srovnání infračervených spekter zaznamenaných ve vybraných časech analýzy nativních PHB granulí upravených lipázou

Vzorek nativních PHB granulí upravených acetonem zadržoval vlhkost přibližně stejnou dobu jako vzorek nativních PHB granulí upravených lipázou. Barva čáry při vlnočtu o hodnotě $1\,278\text{ cm}^{-1}$ je už na počátku analýzy nepatrně intenzivnější než barva čáry v oblasti kolem $1\,184\text{ cm}^{-1}$. Tento rozdíl ale nebyl díky zkreslení signálu přítomností vody příliš rozpoznatelný. Proces vysušení vzorku proběhl oproti předchozímu případu pozvolněji. Krystalinita polymeru uvnitř upravených granulí se po něm ještě více zvýšila, což je zřejmé z intenzivnější barvy čáry při vlnočtu odpovídající vibracím jeho krystalické fáze. Obrázek znázorňující záznam změn hodnot absorpance v infračerveném spektru v čase pro tento vzorek lze nalézt v přílohách (viz kap. 9).

Dále byla pro názornost vybrána infračervená spektra změřená po 1 minutě, 10 minutách, 30 minutách a 120 minutách. V hlavní části práce jsou pro přehlednost uve-

dena pouze spektra s vybraným rozmezím vlnočtů. Celá spektra lze nalézt v přílohách (viz kap. 9).

Na Obr. 31 lze pozorovat změny jednotlivých spekter v průběhu vysoušení vzorku během analýzy. Spektra změřená po 1 minutě a 10 minutách analýzy jsou opět výrazně zkreslena přítomností vody. Stejně jako v předchozím případě je v nich pík odpovídající vibracím amorfní fáze polymeru téměř nerozlišitelný od jejich základních linií, zatímco pík při $1\,278\text{ cm}^{-1}$ lze rozpoznat snadněji. Lze tedy předpokládat, že již na počátku analýzy byl PHB uvnitř granulí upravených acetonem krystalický. Jeho krystalinita byla více patrná od okamžiku poklesu vlhkosti vzorku, kdy ve spektru začaly být znatelné rozdíly intenzit píků při $1\,278\text{ cm}^{-1}$ a $1\,184\text{ cm}^{-1}$. Krystalický stav PHB uvnitř upravených granulí je opět potvrzen přítomností asymetrického píku v rozmezí $1\,750$ až $1\,725\text{ cm}^{-1}$ ve všech spektrech.



Obr. 31: Srovnání infračervených spekter zaznamenaných ve vybraných časech analýzy nativních PHB granulí upravených acetonem

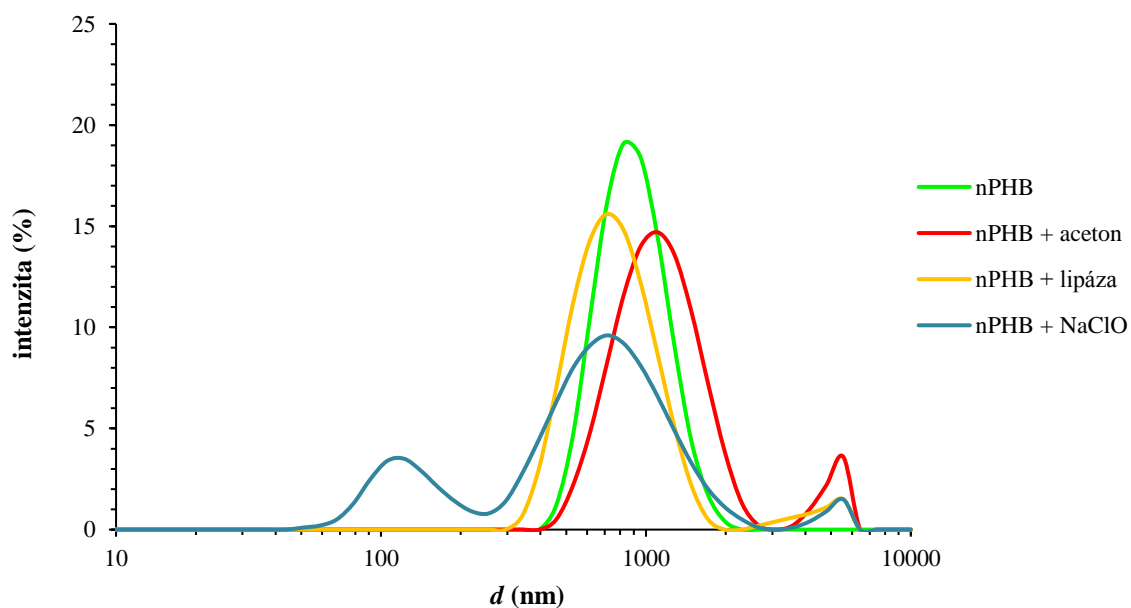
Jelikož je intenzita sledovaných píků v jednotlivých spektrech odlišná, musela být míra krystalizace PHB u všech vzorků ve všech vybraných časech analýzy zjištěna pomocí indexu krystalinity. Ten byl vypočítán podělením hodnot absorbancí píků při $1\,278\text{ cm}^{-1}$ a při $1\,184\text{ cm}^{-1}$. Jeho hodnoty jsou s příslušnou dobou analýzy pro každý vzorek uvedeny v Tab. 8. Na základě těchto hodnot lze jasně stanovit, že krystalinita PHB se nejvíce zvýšila po úpravě granulí lipázou, přičemž její míra dále rostla s tím, jak vzorek postupně vysychal. Po úpravě granulí chlornanem sodným a acetonem bylo dosaženo totožné úrovně krystalinity PHB, ale po jejich vysušení byl více krystalický polymer v granulích upravených acetonem.

Tab. 8: Hodnoty indexu krystalinity PHB u všech vzorků upravených nativních granulí ve vybraných časech analýzy

typ úpravy	doba analýzy (min)	index krystalinity (–)
chlornan sodný	1	1,20
	10	1,21
	30	1,29
	120	1,71
lipáza	1	1,50
	10	1,52
	30	2,00
	120	2,33
aceton	1	1,20
	10	1,22
	30	1,73
	120	1,83

5.3.2 Rozptyl světla

Na základě měření dynamického rozptylu světla byly získány distribuce velikosti nativních PHB granulí upravených různými způsoby. Na Obr. 32 jsou porovnány distribuce upravených nativních PHB granulí izolovaných pomocí lysozymu, deoxyribonukleázy a mechanického rozrušení buněk ultrazvukem s distribucí neupravených nativních PHB granulí.



Obr. 32: Srovnání distribucí velikosti upravených a neupravených nativních PHB granulí izolovaných pomocí lysozymu, deoxyribonukleázy a mechanického rozrušení buněk ultrazvukem (hodnoty velikostí jsou na vodorovné ose uvedeny v logaritmickém měřítku)

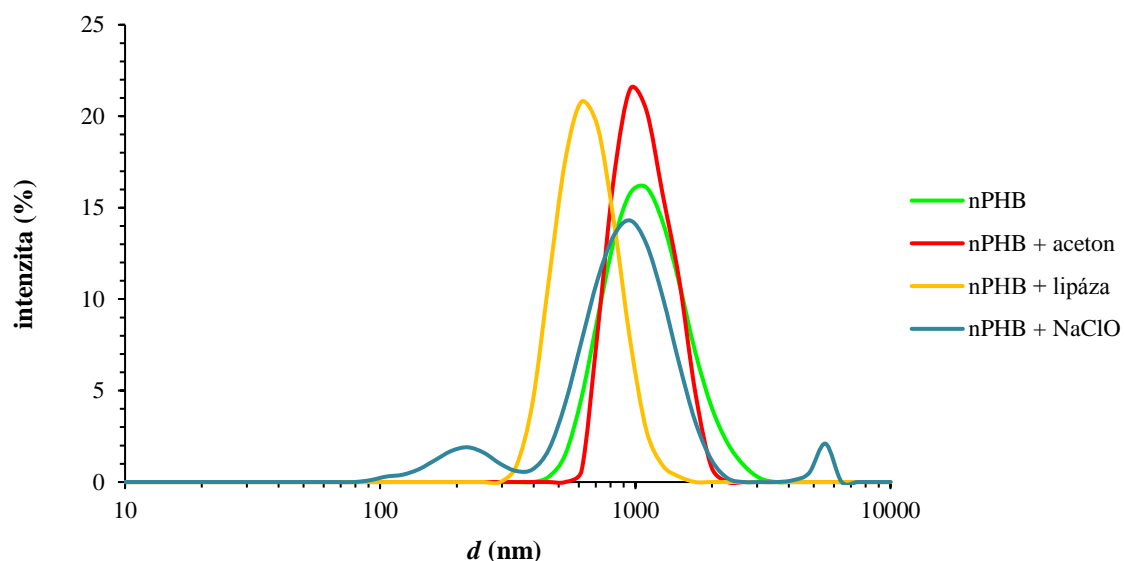
Je zřejmé, že po úpravě nativních PHB granulí acetonem došlo k jejich zvětšení. Naopak po jejich ošetření lipázou či chlornanem sodným se rozměr PHB granulí zmenšil. V případě úpravy chlornanem sodným navíc vznikla frakce částic s výrazně menší velikostí, což lze v odpovídající distribuci pozorovat zvýšením intenzity kolem 100 nm. Tato frakce by mohla představovat lipidy či proteiny odstraněné z povrchové vrstvy granulí působením chlornanu. V distribucích velikosti všech upravených granulí se také vyskytují menší píky odpovídající frakcím částic s větší velikostí. Je ale důležité si uvědomit, že větší částice rozptylují světlo v mnohem větší intenzitě. Zde se tudíž vyskytují jen v zanedbatelném množství. V opačném případě by totiž tvořily dominantní pík a rozptyl světla malými částicemi by byl v intenzitní distribuci kompletně překryt.

Po úpravě PHB granulí vždy mírně vzrostla jejich polydisperzita a zeta potenciál klesl do zápornějších hodnot, avšak všechny vzorky zůstaly nestabilní. Průměrné hodnoty velikostí granulí, jejich zeta potenciálu a indexu polydisperzity jsou včetně směrodatných odchylek uvedeny v Tab. 9.

Tab. 9: Srovnání průměrných hodnot velikosti, indexu polydisperzity a zeta potenciálu upravených a neupravených nativních PHB granulí izolovaných pomocí lysozymu, deoxyribonukleázy a mechanického rozrušení buněk ultrazvukem

typ úpravy	d (nm)	\bar{D} (–)	ζ (mV)
bez úpravy	$922,11 \pm 11,03$	$0,11 \pm 0,02$	$-3,08 \pm 1,29$
aceton	$1\,139,33 \pm 135,20$	$0,33 \pm 0,02$	$-20,80 \pm 0,61$
lipáza	$736,30 \pm 38,40$	$0,24 \pm 0,03$	$-24,40 \pm 1,40$
chlornan sodný	$823,72 \pm 278,30$	$0,51 \pm 0,09$	$-22,87 \pm 0,76$
	$121,54 \pm 25,09$		

Podobné výsledky byly získány i po ošetření nativních PHB granulí izolovaných pomocí alkalázy a SDS (viz Obr. 33). Ve vzorku s granulemi upravenými chlornanem sodným však intenzita frakce výrazně menších částic nebyla tak velká. To by se dalo odůvodnit tím, že povrchová vrstva granulí nebyla v takové míře stabilizována proteiny či lipidy, protože v ní byl z velké části zastoupen i SDS. Působením chlornanu bylo tudíž z povrchové vrstvy odstraněno pouze ono menší množství proteinů a lipidů, což se projevilo menší intenzitou píku okolo 200 nm v porovnání s předchozím způsobem izolace.



Obr. 33: Srovnání distribucí velikosti upravených a neupravených nativních PHB granulí izolovaných pomocí alkalázy a SDS (hodnoty velikostí jsou na vodorovné ose uvedeny v logaritmickém měřítku)

Díky přítomnosti SDS v povrchové vrstvě granulí klesly u všech vzorků v závislosti na použitém způsobu úpravy hodnoty zeta potenciálu do oblasti elektrostatické stability (popř. na její hranici). Průměrné hodnoty velikostí granulí, jejich zeta potenciálu a indexu polydisperzity jsou včetně směrodatných odchylek uvedeny v Tab. 10.

Tab. 10: Srovnání průměrných hodnot velikosti, indexu polydisperzity a zeta potenciálu upravených a neupravených nativních PHB granulí izolovaných pomocí alkalázy a SDS

typ úpravy	d (nm)	\bar{D} (–)	ζ (mV)
bez úpravy	$1\,210,00 \pm 12,73$	$0,12 \pm 0,01$	$-14,10 \pm 2,55$
acetone	$1\,098,00 \pm 49,50$	$0,33 \pm 0,14$	$-29,33 \pm 0,25$
lipáza	$667,55 \pm 20,17$	$0,10 \pm 0,02$	$-38,77 \pm 4,12$
chlornan sodný	$945,55 \pm 36,56$ $229,40 \pm 37,34$	$0,40 \pm 0,03$	$-36,37 \pm 0,83$

6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se věnuje studiu chování polyhydroxybutyrátu uvnitř granulí izolovaných z bakteriálních buněk s využitím vhodných analytických technik. Nejdříve byla popsána produkce a způsob akumulace tohoto polymeru v bakteriálních buňkách, jeho vlastnosti, možnosti izolace a využití. Posléze byly nashromážděny poznatky o analytických metodách umožňujících jeho charakterizaci, zejména z hlediska krystalinity polymeru. Dále byla provedena literární rešerše týkající se současného stavu této problematiky se zaměřením na charakterizaci umělé PHB granulí, nativních PHB granulí uvnitř buněk a po izolaci z buněk.

Prvním úkolem v rámci experimentální části práce byla příprava a charakterizace umělých PHB granulí. Na základě distribucí velikosti vytvořených umělých PHB granulí, jejich zeta potenciálu a indexu polydisperzity byl nejprve zvolen chloroform jako optimální rozpouštědlo PHB. Následně byl studován vliv teploty a délky působení ultrazvukové lázně na tvorbu granulí. Optimálních parametrů (velikost částic, polydisperzita, zeta potenciál) připravených PHB granulí bylo dosaženo při teplotě 35 °C a po 20 a 30 minutách ultrasonifikace. Při studiu vlivu teploty odpařování chloroformu se ukázala být nejvhodnější teplota 60 °C. Podle těchto výsledků pak byly připraveny umělé PHB granule stabilizací lecitinem nebo surfaktanty CTAB, TTAB, SDS a TWEEN® 20. Nejlepší vlastnosti (velikost, zeta potenciál a index polydisperzity) měly granule stabilizované lecitinem a CTAB, což bylo možné rozpoznat i vizuálně. Disperze těchto dvou typů granulí byly v podobě neprůhledného mléčného zákalu. V ostatních disperzích se buď vytvořila vločkovitá sraženina, nebo sediment, díky čemuž byl jejich zákal mnohem méně intenzivní. Lecitinové umělé PHB granule pak byly dále charakterizovány z hlediska krystalinity. Výsledky analýzy pomocí ATR-FTIR ukázaly, že polymer uvnitř těchto granulí byl od samotného počátku měření krystalický. Tento poznatek byl následně potvrzen na základě získaného Ramanova spektra. Přípravou umělých granulí z krystalického PHB tudíž nelze dosáhnout amorfního stavu tohoto polymeru.

Hlavním předmětem experimentální části práce bylo nalézt takovou metodu izolace nativních PHB granulí z bakteriálních buněk, která by zajistila co nejmenší míru krystalizace polymeru. Za těmito účely byly na základě literární rešerše vybrány dva způsoby izolace. První způsob spočíval v digesci suspenze buněk s lysozymem a EDTA, následné destrukci buněk ultrazvukem a další digesci s deoxyribonukleázou. Druhá izolační metoda byla založena na působení alkalázy, SDS a EDTA. Technikou ATR-FTIR pak byla měřena infračervená spektra těchto dvou vzorků PHB granulí v čase. Bylo zjištěno, že polymer uvnitř granulí izolovaných prvním způsobem byl do určité míry krystalický již na počátku měření, přičemž jeho krystalinita v průběhu analýzy ještě vzrostla s tím, jak vzorek postupně vysychal. Naopak PHB uvnitř granulí izolovaných druhou izolační metodou zůstal dlouhou dobu v amorfním stavu, což bylo dáno schopností vzorku zadržovat vlhkost. Krystalizace PHB byla zaznamenána až po více než 80 minutách analýzy vznikem píků odpovídajících vibračním krystalické fáze polymeru v infračerveném spektru. Druhý zmíněný izolační postup se tedy ukázal být šetrnější pro zachování PHB v amorfním stavu. Lze to odůvodnit tím, že při něm nebyla použita metoda mechanického rozrušení buněčných struktur ultrazvukem, při kterém během prvního izolačního postupu mohlo dojít k poškození sa-

motných nativních PHB granulí. Bakteriální buňky navíc nepodléhaly tak intenzivnímu enzymatickému působení, které při první izolační metodě mohlo rovněž přispět k narušení povrchové vrstvy granulí. Významnou roli jistě sehrál i SDS, který granule pravděpodobně ještě výrazněji stabilizoval vůči krystalizaci polymeru. Jeho přítomnost v povrchové vrstvě se projevila i zápornější hodnotou naměřeného zeta potenciálu. Kromě výše uvedeného se na základě výsledků z TMDSC analýzy polymer uvnitř granulí izolovaných pomocí alkalázy, EDTA a SDS jevil také jako tepelně stabilnější.

Nakonec byla sledována míra krystalizace PHB po úpravě nativních granulí chlornanem sodným, lipázou a acetonem. Pomocí ATR-FTIR byly studovány pouze upravené granule izolované pomocí alkalázy, SDS a EDTA, jelikož v nich polymer po izolaci zůstal v amorfním stavu, a proto bylo předpokládáno, že změny jeho krystalinity budou snáze pozorovatelné než v případě částečně krystalického PHB v granulích izolovaných pomocí lysozymu, EDTA, deoxyribonukleázy a mechanického rozrušení buněk ultrazvukem. Dalo by se očekávat, že krystalinita PHB vzroste nejvíce po ošetření nativních granulí chlornanem sodným, který z jejich povrchové vrstvy účinkem vysokého pH odstraní jak proteiny, tak lipidy. Výsledky analýzy ovšem ukázaly, že krystalinitu polymeru nejvíce zvýšilo působení lipázy, přičemž míra krystalizace PHB po úpravě granulí chlornanem sodným byla stejná jako v případě granulí ošetřených acetonem. To by se dalo vysvětlit tím, že lipáza interagovala s nativními PHB granulemi mnohem déle než chlornan sodný, čímž více přispěla ke krystalizaci tohoto polyesteru. Výrazný vliv na krystalinitu PHB v granulích upravených chlornanem sodným měla bezesporu i vysoká vlhkost vzorku, díky níž byla po většinu času měření zastíněna intenzita píků příslušejících vibračním krystalické a amorfní fáze polymeru v infračerveném spektru. Technikami rozptylu světla byly studovány upravené granule izolované oběma způsoby. Bylo zjištěno, že po jejich úpravě docházelo vždy ke změně jejich velikosti, což mohlo souviset se zvětšením, popř. eliminací hydratačního obalu. Ramanovou spektroskopií a TMDSC nebyly analyzovány žádné upravené nativní PHB granule, jelikož by ve výsledcích z těchto metod změny spojené s ošetřením granulí pravděpodobně nebyly detekovatelné.

Na závěr lze poznamenat, že pro charakterizaci PHB uvnitř granulí se použité metody ukázaly být vhodně zvolené. Metoda ATR-FTIR poskytla nejdůvěryhodnější výsledky z hlediska krystalinity polymeru, které byly částečně potvrzeny Ramanovou spektroskopií. Techniky založené na rozptylu světla umožnily sledovat chování PHB granulí v koloidních systémech. Výsledky z TMDSC pak doplnily především informace o tepelné stabilitě polymeru uvnitř granulí. Aby byla tato technika použitelná pro studium krystalinity PHB, bylo by nutné jednotlivá měření několikrát zopakovat, a zároveň se zaměřit na neobvyklé jevy vyskytující se v záznamech analýzy. Pro získání ucelenějších poznatků o chování PHB granulí a jejich komplexnější charakterizaci by jistě posloužila například rentgenová difraktoetrie nebo některá ze zobrazovacích metod.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BUGNICOURT, E. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*. 2014, 8 (11), 791–808. DOI: 10.3144/expresspolymlett.2014.82. ISSN 1788618x.
- [2] KESSLER, Birgit a Bernard WITHOLT. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *Journal of Biotechnology*. 2001, 86 (2), 97–104. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00404-1. ISSN 01681656.
- [3] LEE, Sang Yup, Si Jae PARK, Yoshiharu DOI a Alexander STEINBÜCHEL. Fermentative Production of SCL Polyhydroxyalkanoates (SCL-PHAs). *Biopolymers Online*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2005. DOI: 10.1002/3527600035.bpol3a09.
- [4] SINGH SAHARAN, Baljeet, Anita GREWAL a Pardeep KUMAR. Biotechnological Production of Polyhydroxyalkanoates: A Review on Trends and Latest Developments. *Chinese Journal of Biology*. 2014, 1–18. DOI: 10.1155/2014/802984. ISSN 2314–7474.
- [5] BUELHAMD, AT, DAM ABD-EL-HALEEM, SA ZAKI, A AMARA a GMS ABOELREESH. Genetic engineering of *Schizosaccharomyces pombe* to produce Bacterial Polyhydroxyalkanotes. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. 2010, 11 (2). DOI: 10.4314/jasem.v11i2.54996. ISSN 1119–8362.
- [6] REZZONICO, Enea, Laurence MOIRE a Yves POIRIER. Polymers of 3-hydroxyacids in plants. *Phytochemistry Reviews*. 2002, 1 (1), 87–92. DOI: 10.1023/A:1015888420468. ISSN 1568-7767.
- [7] KHANNA, Shilpi a Ashok K. SRIVASTAVA. Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry*. 2005, 40 (6), 2173–2182. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.08.011. ISSN 13595113.
- [8] CASTILHO, Leda R., David A. MITCHELL a Denise M.G. FREIRE. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresource Technology*. 2009, 100 (23), 5996–6009. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.03.088. ISSN 09608524.
- [9] Ishizaki, A., Tanaka, K., Takeshita, T., Kanemaru, T., Shimoji, T., Kawano, T.: Equipment and operation for fermentative PHB production using gaseous substrate to guarantee safety from explosion. *Journal of Chemical Engineering of Japan*. 1993, 26, 225–227. ISSN 0021-9592.
- [10] KESSLER, Birgit a Bernard WITHOLT. Poly(3-Hydroxyalkanoates). *Encyclopedia of Bioprocess Technology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2002. DOI: 10.1002/0471250589.ebt168.
- [11] MOSKOWITZ, Gerard Jay a Joseph M. MERRICK. Metabolism of poly- β -hydroxybutyrate. II. Enzymic synthesis of D-(-)- β -hydroxybutyryl coenzyme A by

an enoyl hydratase from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry*. 1969, 8 (7), 2748–2755. DOI: 10.1021/bi00835a009. ISSN 0006-2960.

- [12] KESSLER, Birgit a Bernard WITHOLT. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *Journal of Biotechnology*. 2001, 86 (2), 97–104. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00404-1. ISSN 01681656.
- [13] JENDROSSEK, Dieter a Daniel PFEIFFER. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environmental Microbiology*. 2014, 16 (8), 2357–2373. DOI: 10.1111/1462-2920.12356. ISSN 14622912.
- [14] KHANNA, Shilpi a Ashok K. SRIVASTAVA. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*. 2005, 40 (2), 607–619. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.01.053. ISSN 13595113.
- [15] TANADCHANGSAENG, Nuttapol. Structure, chemomechanical properties and degradability of polyhydroxyalkanoates: A review. *Bulletin of Health, Science and Technology*. 2014, 12 (1), 9–21.
- [16] Poly(3-hydroxybutyrate). MARK, James E. *Polymer data handbook*. 2nd edition. New York: Oxford University Press, 2009, s. 744–745. ISBN 0195181018.
- [17] KUNASUNDARI, B. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polymer Letters*. 2011, 5 (7), 620–634. DOI: 10.3144/expresspolymlett.2011.60. ISSN 1788618x.
- [18] JACQUEL, Nicolas, Chi-Wei LO, Yu-Hong WEI, Ho-Shing WU a Shaw S. WANG. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*. 2008, 39 (1), 15–27. DOI: 10.1016/j.bej.2007.11.029. ISSN 1369703x.
- [19] GRAGE, Katrin, Anika C. JAHNS, Natalie PARLANE, Rajasekaran PALANI-SAMY, Indira A. RASIAH, Jane A. ATWOOD a Bernd H. A. REHM. Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. *Biomacromolecules*. 2009, 10 (4), 660–669. DOI: 10.1021/bm801394s. ISSN 1525-7797.
- [20] BRESAN, Stephanie, Anna SZNAJDER, Waldemar HAUF, Karl FORCHHAMMER, Daniel PFEIFFER a Dieter JENDROSSEK. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. *Scientific Reports*. 2016-5-25, 6, 26612–. DOI: 10.1038/srep26612. ISSN 2045-2322.
- [21] SUDESH, K., H. ABE a Y. DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. 2000, 25 (10), 1503–1555. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. ISSN 00796700.
- [22] MIKOVÁ, Gizela a Ivan CHODÁK. Vlastnosti a modifikácia poly(3-hydroxybutyrátu). *Chemické listy*. 2006, 100 (12), 1075–1083.

- [23] MÉNDEZ-VILAS, Antonio. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Badajoz: Formatex, 2007, s. 295–307. ISBN 978-84-611-9422-3.
- [24] BUMBRAH, Gurvinder Singh a Rakesh Mohan SHARMA. Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*. 2016, 6 (3), 209-215. DOI: 10.1016/j.ejfs.2015.06.001. ISSN 2090536x.
- [25] WILSON, E. Bright, J. C. DECIUS a Paul C. CROSS. *Molecular vibrations: the theory of infrared and Raman vibrational spectra*. New York: Dover Publications, 1955. ISBN 04-866-3941-X.
- [26] CRAWFORD Anne, Edmir SILVA, Karen YORK a Chenxiang LI. Raman Spectroscopy: A Comprehensive Review, TMS Raman Report Group, 7; 1–34. Dostupné z: https://www.academia.edu/1131363/Raman_Spectroscopy_A_Comprehensive_Review.
- [27] What are the most common applications of Raman spectroscopy? *HORIBA Scientific Instruments* [online]. Kyoto: HORIBA, ©1996-2016 [cit. 2016-11-25]. Dostupné z: <http://www.horiba.com/scientific/products/raman-spectroscopy/raman-academy/raman-faqs/>.
- [28] STUART, B.H. Polymer crystallinity studied using Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*. 1996, 10 (2), 79–87. DOI: 10.1016/0924-2031(95)00042-9. ISSN 09242031.
- [29] KRAUS, Ivo. *Úvod do strukturní rentgenografie*. Praha: Academia, 1985, 236 s.
- [30] ŽÁK, Zdirad. *Rentgenová difrakce a studium struktury látek*. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1982, 214 s.
- [31] NORTON, M. Grant a C. SURYANARAYANA. *X-Ray diffraction: A practical approach*. New York: Plenum Press, 1998, 273 s. ISBN 03-064-5744-X
- [32] XOS. *X-ray Diffraction (XRD)* [online]. USA [cit. 2016-11-26]. Dostupné z: <http://www.xos.com/techniques/xrd/>.
- [33] HALLIDAY, David, Robert RESNICK a Jearl WALKER. *Fyzika: vysokoškolská učebnice obecné fyziky*. Brno: VUTUM, 2000. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 80-214-1868-0.
- [34] X-ray Powder Diffraction (XRD). *Science Education Resource Center* [online]. Northfield: Carleton College, 2016 [cit. 2016-11-27]. Dostupné z: http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/XRD.html
- [35] MAREK, Jaromír a Zdeněk TRÁVNÍČEK. *Monokrystalová rentgenová strukturní analýza*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2002, 169 s. ISBN 80-244-0551-2.

- [36] Size Determination by Dynamic Light Scattering. *WYATT Technology Europe* [online]. © 2016 [cit. 2016-12-29]. Dostupné z: <http://www.wyatt.eu/index.php?id=dynamic-light-scattering>.
- [37] *Zetasizer Nano Příručka pro uživatele*. 3. vydání. Malvern instruments Ltd., Spojené království, 2007, 191 s.
- [38] COSGROVE, T. *Colloid science: principles, methods and applications*. 2nd ed. Chichester, West Sussex: Wiley, 2010, xiv, 375 p. ISBN 978-144-4320-206.
- [39] Malvern Instruments Ltd.: Stabilita suspenzí a disperzí – Proč jsou parametry jako velikost částic, zeta potenciál a reologické vlastnosti tak důležité?. *Chemagazín*, 2011, vol. 21, issue 4, s. 14–16.
- [40] GOLDSTEIN, Joseph. *Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis*. 3rd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. ISBN 03-064-7292-9.
- [41] Scanning electron microscopy (SEM). *Science Education Resource Center* [online]. Northfield: Carleton College, 2017 [cit. 2017-01-30]. Dostupné z: http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html.
- [42] KHURSHEED, Anjam. *Scanning electron microscope optics and spectrometers*. Singapore: World Scientific, 2011. ISBN 978-981-2836-670.
- [43] MORRIS, V. J. a K. GROVES. *Food Microstructures: Microscopy, measurement and modelling*. Woodhead Publishing Limited. 2013. ISBN 978-0-85709-525-1.
- [44] Cryo-SEM. *TESCAN USA* [online]. TESCAN ORSAY HOLDING, © 2012 [cit. 2017-01-30]. Dostupné z: <http://www.tescan-usa.com/applications/life-sciences/cryo-sem>.
- [45] GALLAGHER, Patrick K., Michael E. BROWN a Richard B. KEMP. *Handbook of thermal analysis and calorimetry*. New York: Elsevier, 2003. ISBN 04-448-2088-4.
- [46] HAINES, P. J. *Principles of thermal analysis and calorimetry*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2002. ISBN 08-540-4610-0.
- [47] EHRENSTEIN, Gottfried W., Gabriela. RIEDEL a Pia. TRAWIEL. *Thermal analysis of plastics: theory and practice*. Cincinnati: Hanser Gardner Publications [distributor], 2004. ISBN 34-462-2673-7.
- [48] VERLINDEN, R.A.J., D.J. HILL, M.A. KENWARD, C.D. WILLIAMS a I. RADECKA. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, 102 (6), 1437-1449. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x. ISSN 1364-5072.
- [49] RODRÍGUEZ-CONTRERAS, Alejandra, Cristina CANAL, Margarita CALAFELL-MONFORT, Maria-Pau GINEBRA, Gemma JULIO-MORAN a María-Soledad MARQUÉS-CALVO. Methods for the preparation of doxycycline-loaded phb micro- and nano-spheres. *European Polymer Journal*.

- 2013, 49 (11), 3501-3511. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2013.08.010. ISSN 00143057.
- [50] KWON, Hee-Su, Sung-Geun JUNG, Hae-Yeong KIM, Stephanie A. PARKER, Carl A. BATT a Young-Rok KIM. A multi-functional polyhydroxybutyrate nanoparticle for theranostic applications. *Journal of Materials Chemistry B*. 2014, 2 (25), 3965–. DOI: 10.1039/c4tb00304g. ISSN 2050-750x.
- [51] CASTELLANO, Delia, Ana SANCHIS, María BLANES, et al. Electrospun poly(hydroxybutyrate) scaffolds promote engraftment of human skin equivalents via macrophage M2 polarization and angiogenesis. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2017. DOI: 10.1002/term.2420. ISSN 19326254.
- [52] KHORASANI, M. T., S. A. MIRMOHAMMADI a S. IRANI. Polyhydroxybutyrate (PHB) Scaffolds as a Model for Nerve Tissue Engineering Application: Fabrication and In Vitro Assay. *International Journal of Polymeric Materials*. 2011, 60 (8), 562–575. DOI: 10.1080/00914037.2010.531809. ISSN 0091-4037.
- [53] Agladze, N. N., N. I. DORONINA a K. I. AGLADZE. Cardiac tissue engineering with the aid of polyhydroxybutyrate membranes and nanofibers. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 2013, 7 (12), 1168–1174.
- [54] CHAUHAN, Ashish. Powder XRD Technique and its Applications in Science and Technology. *Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques*. 2014, 5 (6). DOI: 10.4172/2155-9872.1000212. ISSN 21559872.
- [55] DAS, Rasel, Md. Eaqub ALI a Sharifah BEE ABD HAMID. Current applications of x-ray powder diffraction – A review. *Reviews on advanced materials science*. 2014, 38 (2), 95–109.
- [56] PRŮŠOVÁ, Alena. Teplotně modulovaná diferenční kompenzační kalorimetrie (TMDSC). *ChemPoint* [online]. Brno: Vysoké učení technické v Brně, 2011 [cit. 2017-02-04]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/teplotne-modulovana-diferencni-kompenzacni-kalorimetrie-tmdsc>.
- [57] PODZIMEK, Jakub. Termická analýza kompozitních materiálů s polymerní maticí. *TRANSFER Výzkum a vývoj pro letecký průmysl*. Praha: Výzkumný a zkušební letecký ústav, 2015, s. 14–16. ISSN 1801-9315.
- [58] SAMEK, Ota, Stanislav OBRUČA, Martin ŠILER, et al. Quantitative Raman Spectroscopy Analysis of Polyhydroxyalkanoates Produced by *Cupriavidus necator* H16. *Sensors*. 2016, 16 (12), 1808–. DOI: 10.3390/s16111808. ISSN 1424-8220.
- [59] PORTER, Michael a Jian YU. Monitoring the in situ crystallization of native biopolyester granules in *Ralstonia eutropha* via infrared spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods*. 2011, 87 (1), 49–55. DOI: 10.1016/j.mimet.2011.07.009. ISSN 01677012.

- [60] DE KONING, G.J.M a P.J LEMSTRA. The amorphous state of bacterial poly[(R)-3-hydroxyalkanoate]in vivo. *Polymer*. 1992, 33 (15), 3292–3294. DOI: 10.1016/0032-3861(92)90249-V. ISSN 00323861.
- [61] KAWAGUCHI, Y. a Y. DOI. Structure of native poly(3-hydroxybutyrate) granules characterized by X-ray diffraction. *FEMS Microbiology Letters*. 1990, 70 (2), 151–155. DOI: 10.1016/S0378-1097(05)80030-8. ISSN 03781097.
- [62] LAUZIER, C., J.-F. REVOL a R.H. MARCHESSAULT. Topotactic crystallization of isolated poly(3-hydroxybutyrate) granules from *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Letters*. 1992, 103 (2–4), 299–310. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05851.x. ISSN 03781097.
- [63] MARTINO, Lucrezia, Madalena V. CRUZ, Alberto SCOMA, Filomena FREITAS, Lorenzo BERTIN, Mariastella SCANDOLA a Maria A.M. REIS. Recovery of amorphous polyhydroxybutyrate granules from *Cupriavidus necator* cells grown on used cooking oil. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014, 71, 117–123. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.04.016. ISSN 01418130.
- [64] HOROWITZ, Daniel M. a Jeremy K. M. SANDERS. Amorphous, biomimetic granules of polyhydroxybutyrate: preparation, characterization, and biological implications. *Journal of the American Chemical Society*. 1994, 116 (7), 2695–2702. DOI: 10.1021/ja00086a001. ISSN 0002-7863.
- [65] RHO, Jong Kook, Mun Hwan CHOI, Merced GUTIERREZ, Baoxia TIAN, Taesik YOO, Jung Eun BAEK, Mohsin SHAH a Sung Chul YOON. Amorphous poly(3-hydroxybutyrate) nanoparticles prepared with recombinant phasins and PHB depolymerase. *Journal of Applied Polymer Science*. 2014, 131 (22). DOI: 10.1002/app.41074. ISSN 00218995.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam zkratek

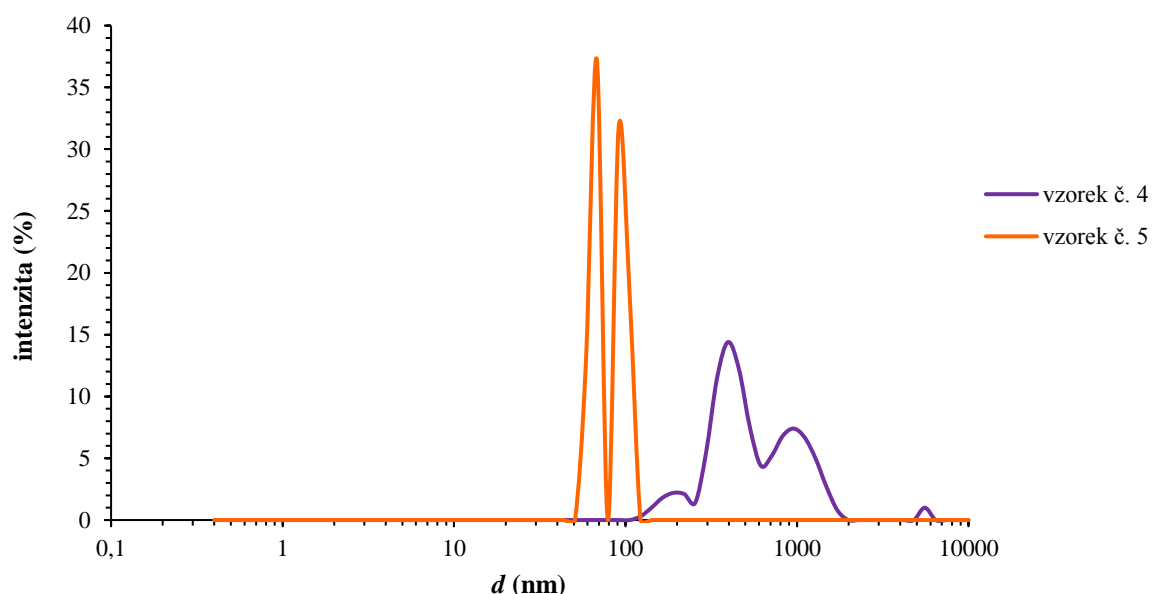
Zkratka	Význam
PHA	polyhydroxyalkanoát
PHB	polyhydroxybutyrát
nPHB	nativní polyhydroxybutyrát
CoA	koenzym A
NADH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
PhaR	regulační protein exprese phasinů
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
HV	hydroxyvalerát
PCL	polykaprolakton
PP	polypropylen
UV	ultrafialový (ultraviolet)
SDS	dodecylsulfát sodný
Nd	neodym
YAG	yttrium aluminium granát
He-Ne	helium-neon
CTD	zařízení přenosu náboje (charge transfer device)
PDA	diodové pole (photodiode array)
XRD	rentgenová difraktometrie
DLS	dynamický rozptyl světla (dynamic light scattering)
ELS	elektroforetický rozptyl světla (electrophoretic light scattering)
SEM	rastrovací elektronová mikroskopie (scanning electron microscopy)
DSC	diferenční kompenzační kalorimetrie (differential scanning calorimetry)
TMDSC	teplotně modulovaná diferenční kompenzační kalorimetrie
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast spektra (ultraviolet-visible)
ATR	zeslabený úplný odraz (attenuated total reflectance)
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (Fourier transform infrared)
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
TTAB	tetradecyltrimethylammonium bromid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina (ethylenediaminetetraacetic acid)

8.2 Seznam symbolů

Symbol	Význam
nm	nanometr
μm	mikrometr
mm	milimetr
cm	centimetr

cm^{-1}	reciproký centimetr
dm	decimetr
Da	Dalton
$^{\circ}\text{C}$	stupeň Celsia
GPa	gigapascal
MPa	megapascal
mV	milivolt
mg	miligram
g	gram
s	sekunda
W	watt
T_{m}	teplota tání
T_{g}	teplota skelného přechodu
ν	vibrační kvantové číslo
d'	vzdálenost mezi atomovými rovinami krystalu
θ	difrakční úhel
λ	vlnová délka
n	řád reflexe
h	Planckova konstanta
m_e	hmotnost elektronu
v_e	rychlost elektronu
E	energie
U	napětí
r_h	hydrodynamický poloměr částice
k_{B}	Boltzmannova konstanta
T	termodynamická teplota
π	Ludolfovo číslo
η	viskozita
D	difúzní koeficient
ν	elektroforetická pohyblivost
D_e	dielektrická konstanta
ζ	zeta potenciál
l	délka kyvety
M_{w}	molekulová hmotnost
d	velikost částic
\bar{D}	index polydisperzity
t_{U}	doba ultrasonifikace
T_{U}	teplota ultrasonifikace

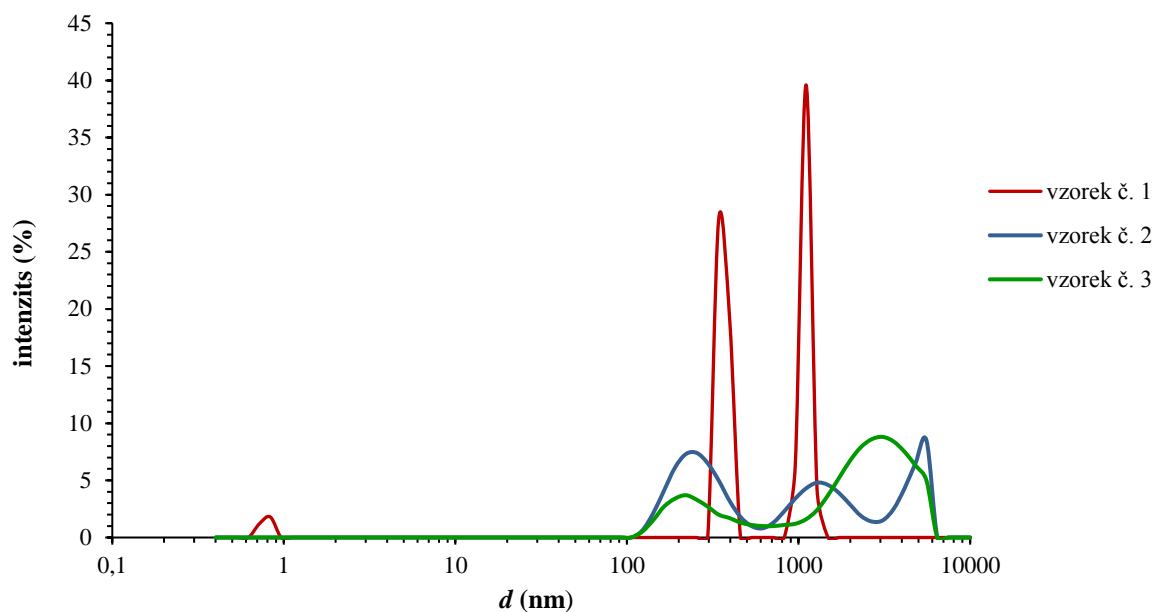
9 PŘÍLOHY



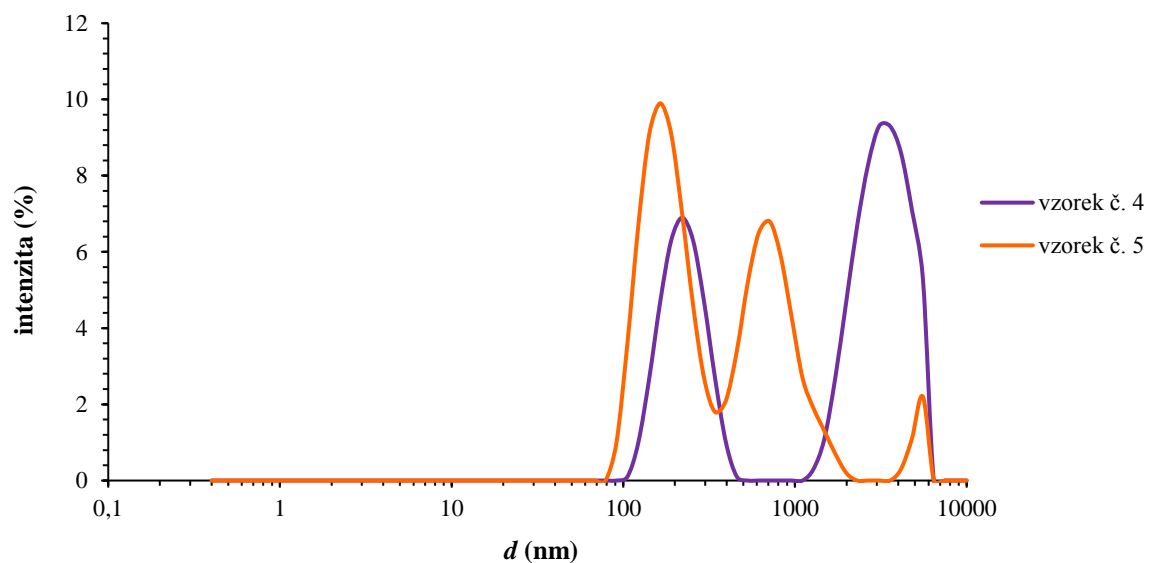
Příloha č. 1: Distribuce velikosti umělé PHB granule po ultrasonifikaci při 35 °C ve vzorku č. 4 a č. 5, tedy po dvou a třech desetiminutových intervalech ultrasonifikace s pětiminutovou přestávkou mezi nimi (hodnoty velikostí jsou na vodorovné ose uvedeny v logaritmickém měřítku)

Příloha č. 2: Průměrné hodnoty velikosti a zeta potenciálu umělé PHB granule po ultrasonifikaci při 35 °C ve vzorcích č. 1 až č. 5 (tedy po 10, 20, 30 minutách ultrasonifikace a po dvou a třech desetiminutových intervalech ultrasonifikace s pětiminutovou přestávkou mezi nimi)

číslo vzorku	d (nm)	\bar{D} (–)	ζ (mV)
1	$3\,011,50 \pm 228,40$	$0,70 \pm 0,02$	$44,50 \pm 0,44$
2	$430,90 \pm 10,11$	$0,40 \pm 0,08$	$56,95 \pm 1,06$
3	$284,30 \pm 4,00$	$0,20 \pm 0,01$	$61,80 \pm 1,93$
4	$665,65 \pm 263,40$	$0,57 \pm 0,28$	$13,30 \pm 0,64$
5	$79,70 \pm 16,40$	$0,91 \pm 0,14$	$50,10 \pm 2,12$



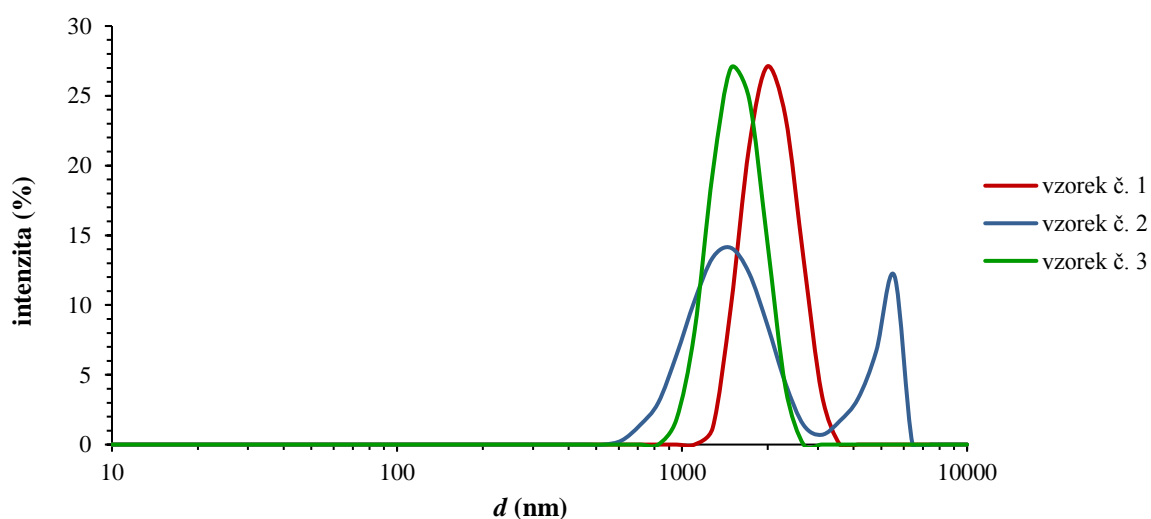
Příloha č. 3: Distribuce velikosti umělé PHB granule po ultrasonifikaci při 25 °C ve vzorku č. 1, č. 2 a č. 3, tedy po 10, 20 a 30 minutách ultrasonifikace (hodnoty velikostí jsou na vodorovné ose uvedeny v logaritmickém měřítku)



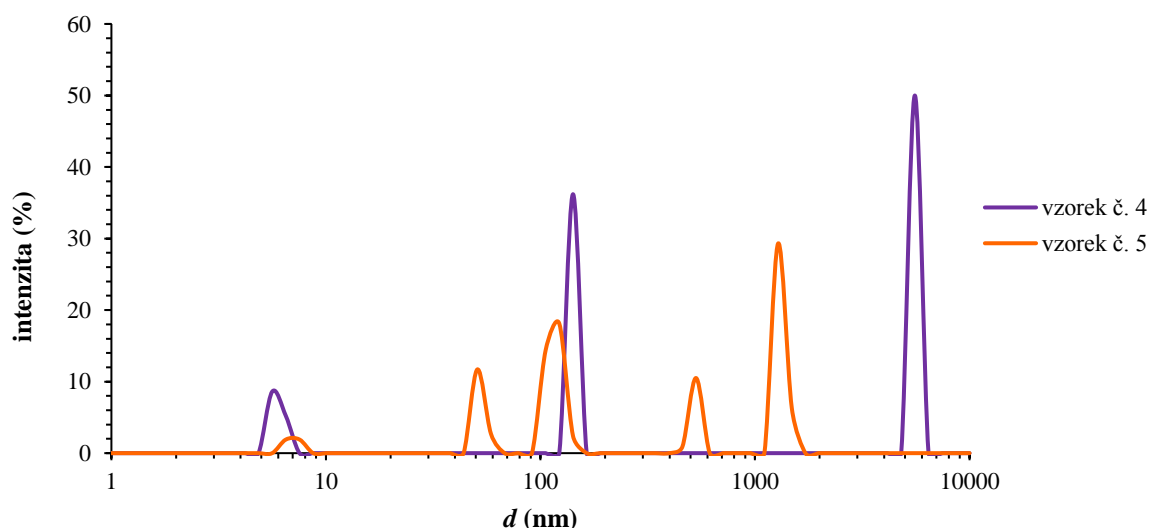
Příloha č. 4: Distribuce velikosti umělé PHB granule po ultrasonifikaci při 25 °C ve vzorku č. 4 a č. 5, tedy po dvou a třech desetiminutových intervalech ultrasonifikace s pětiminutovou přestávkou mezi nimi (hodnoty velikostí jsou na vodorovné ose uvedeny v logaritmickém měřítku)

Příloha č. 5: Průměrné hodnoty velikosti, indexu polydisperzity a zeta potenciálu umělé PHB granule po ultrasonifikaci při 25 °C ve vzorcích č. 1 až č. 5 (tedy po 10, 20, 30 minutách ultrasonifikace a po dvou a třech desetiminutových intervalech ultrasonifikace s pětiminutovou přestávkou mezi nimi)

číslo vzorku	d (nm)	\bar{D} (-)	ζ (mV)
1	$1\,103,00 \pm 73,54$ $364,1 \pm 26,58$	$1,00 \pm 0,00$	$53,23 \pm 4,80$
2	$1\,414,00 \pm 508,50$	$0,95 \pm 0,03$	$51,57 \pm 4,02$
3	$2\,930,00 \pm 4,24$ $257,20 \pm 46,18$	$1,00 \pm 0,00$	$29,53 \pm 1,35$
4	$3\,389,00 \pm 309,70$ $228,30 \pm 3,54$	$0,98 \pm 0,02$	$25,77 \pm 2,23$
5	$181,40 \pm 38,68$ $758,10 \pm 58,19$	$0,56 \pm 0,07$	$40,77 \pm 2,05$



Příloha č. 6: Distribuce velikosti umělé PHB granule po ultrasonifikaci při 40 °C ve vzorku č. 1, č. 2 a č. 3, tedy po 10, 20 a 30 minutách ultrasonifikace (hodnoty velikostí jsou na vodorovné ose uvedeny v logaritmickém měřítku)



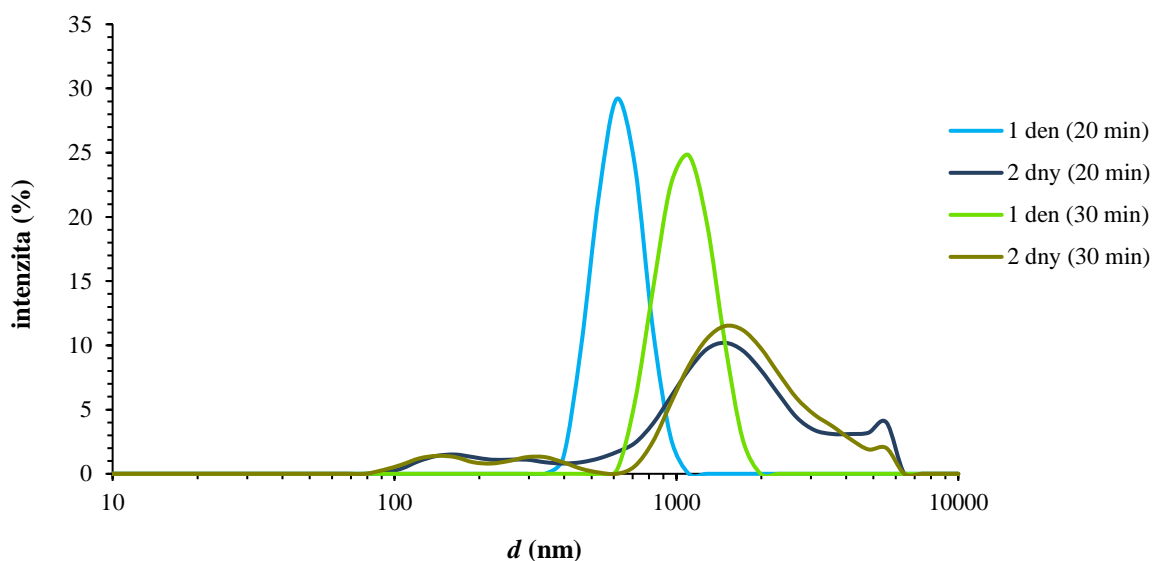
Příloha č. 7: Distribuce velikosti umělé PHB granulí po ultrasonifikaci při 40 °C ve vzorku č. 4 a č. 5, tedy po dvou a třech desetiminutových intervalech ultrasonifikace s pětiminutovou přestávkou mezi nimi (hodnoty velikostí jsou na vodorovné ose uvedeny v logaritmickém měřítku)

Příloha č. 8: Průměrné hodnoty velikosti, indexu polydisperzity a zeta potenciálu umělé PHB granulí po ultrasonifikaci při 40 °C ve vzorcích č. 1 až č. 5 (tedy po 10, 20, 30 minutách ultrasonifikace a po dvou a třech desetiminutových intervalech ultrasonifikace s pětiminutovou přestávkou mezi nimi)

číslo vzorku	d (nm)	\bar{D} (–)	ζ (mV)
1	$2\,078,00 \pm 57,8$	$0,30 \pm 0,03$	$36,60 \pm 1,87$
2	$1\,489,00 \pm 177,50$ $5\,070,00 \pm 463,20$	$0,48 \pm 0,03$	$38,83 \pm 4,43$
3	$1\,570,00 \pm 53,74$	$0,28 \pm 0,05$	$29,17 \pm 3,32$
4	$8\,230,50 \pm 2\,028,69$	$0,14 \pm 0,05$	$19,45 \pm 1,63$
5	$5\,899,00 \pm 257,77$	$0,55 \pm 0,03$	$42,87 \pm 1,17$

Příloha č. 9: Průměrné hodnoty velikosti, indexu polydisperzity a zeta potenciálu umělé PHB granulí po 30 minutách ultrasonifikace a odpařování rozpouštědla při různých teplotách

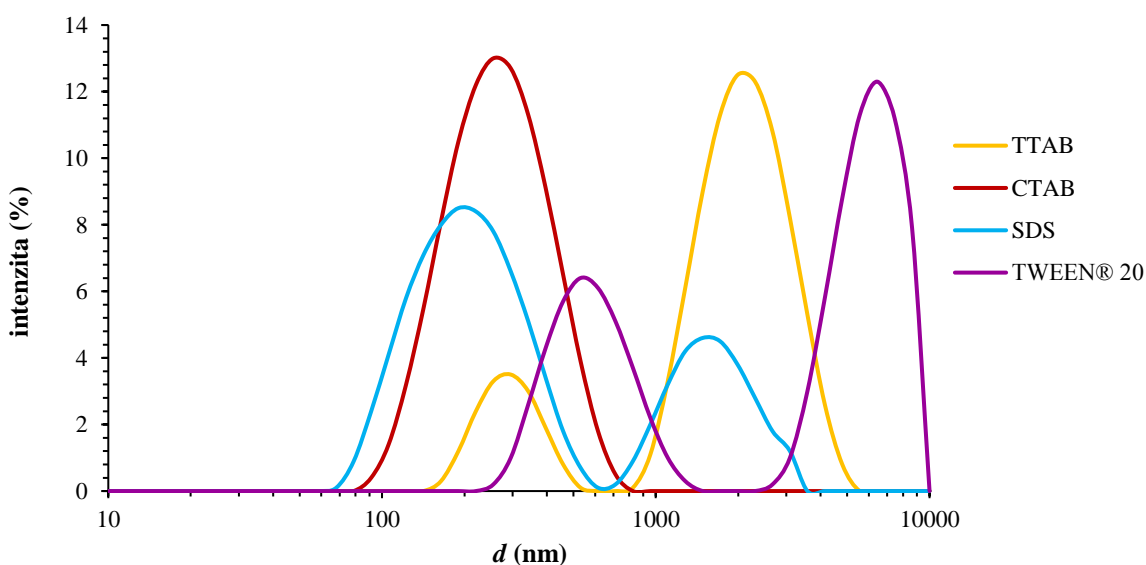
T (°C)	d (nm)	\bar{D} (–)	ζ (mV)
50	$2\,441,00 \pm 354,40$ $123,10 \pm 18,48$	$0,98 \pm 0,02$	$40,15 \pm 1,63$
60	$284,30 \pm 4,00$	$0,20 \pm 0,01$	$61,80 \pm 1,93$
70	$382,20 \pm 38,94$	$1,00 \pm 0,00$	$45,43 \pm 3,27$
80	$137,00 \pm 10,14$ $587,70 \pm 75,79$	$1,00 \pm 0,00$	$53,00 \pm 2,54$



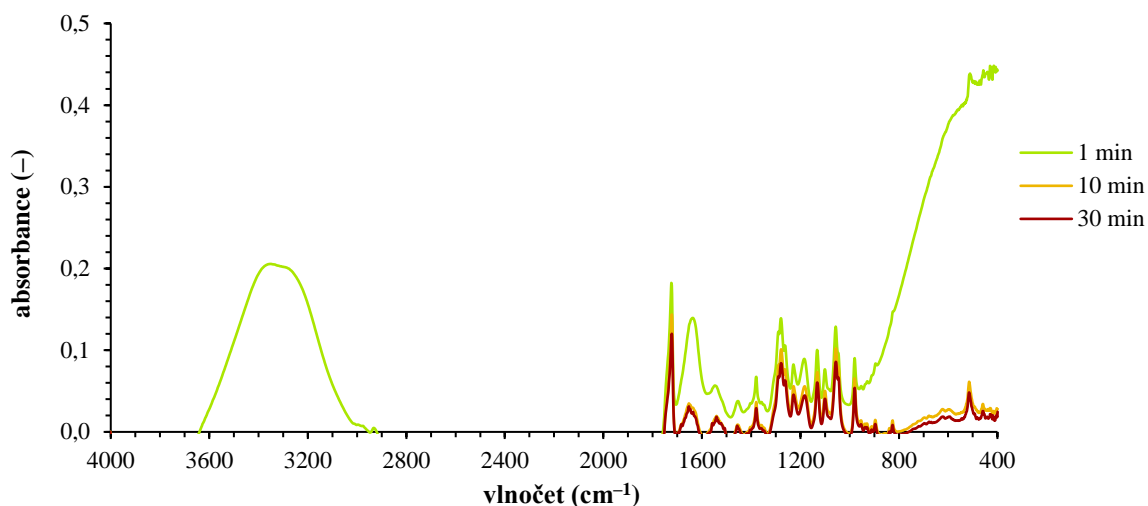
Příloha č. 10: Distribuce velikosti umělé PHB granulí po 20 a 30 minutách ultrasonifikace a po 1 a 2 dnech odpařování rozpouštědla při laboratorní teplotě (hodnoty velikostí jsou na vodorovné ose uvedeny v logaritmickém měřítku)

Příloha č. 11: Průměrné hodnoty velikosti, indexu polydisperzity a zeta potenciálu umělé PHB granulí po 20 a 30 minutách ultrasonifikace a po 1 a 2 dnech odpařování rozpouštědla při laboratorní teplotě

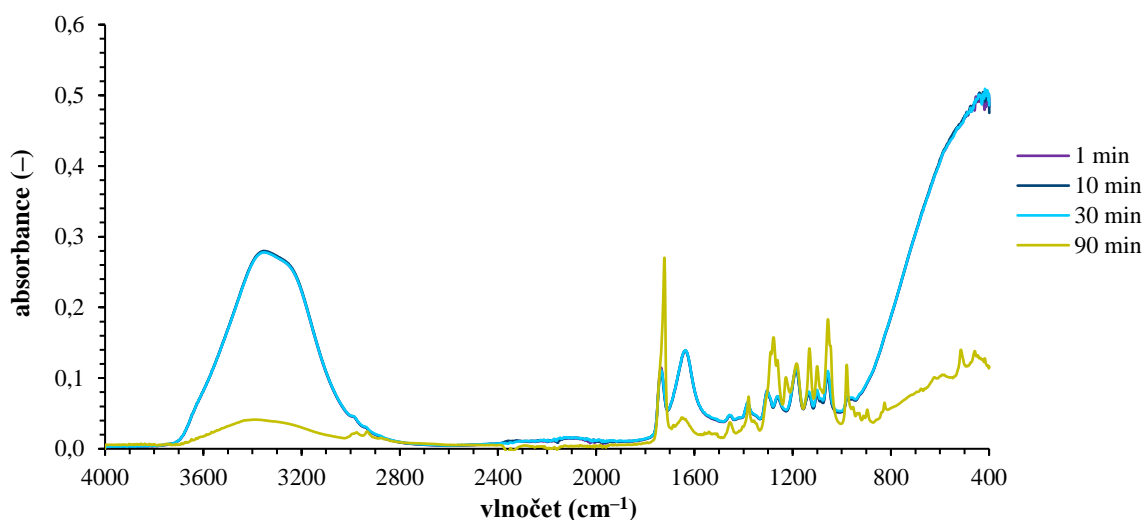
t_U (min)	t (den)	d (nm)	\bar{D} (–)	ζ (mV)
20	1	$763,40 \pm 19,23$	$0,39 \pm 0,05$	$46,20 \pm 1,57$
	2	$1\,212,50 \pm 7,78$	$0,52 \pm 0,05$	$36,73 \pm 0,76$
30	1	$1\,204,00 \pm 14,14$	$0,38 \pm 0,03$	$48,17 \pm 3,26$
	2	$1\,298,00 \pm 24,04$	$0,59 \pm 0,13$	$39,80 \pm 2,85$



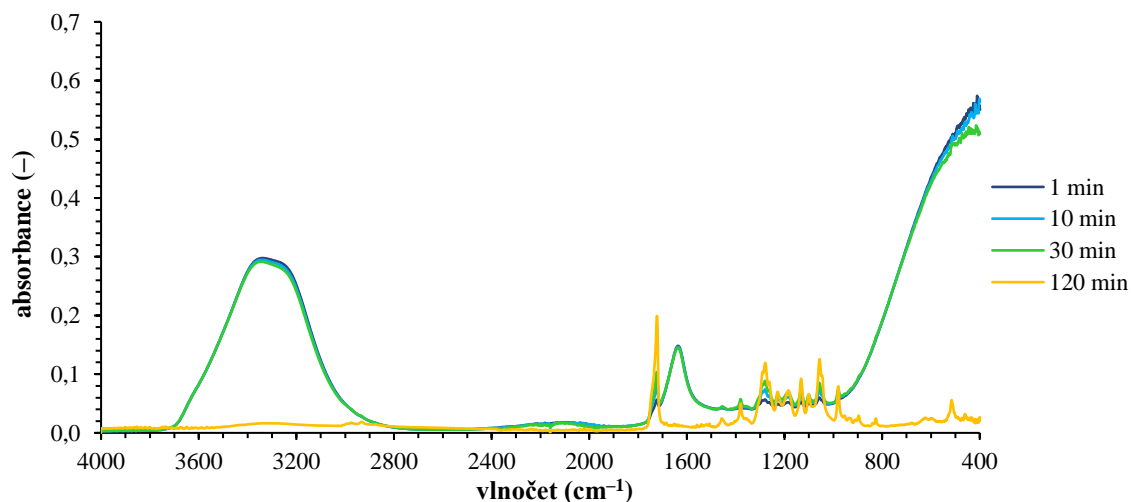
Příloha č. 12: Srovnání distribucí velikosti umělé PHB granulí stabilizovaných tenzidy po 30 minutách ultrasonifikace (hodnoty velikostí jsou na vodorovné ose uvedeny v logaritmickém měřítku)



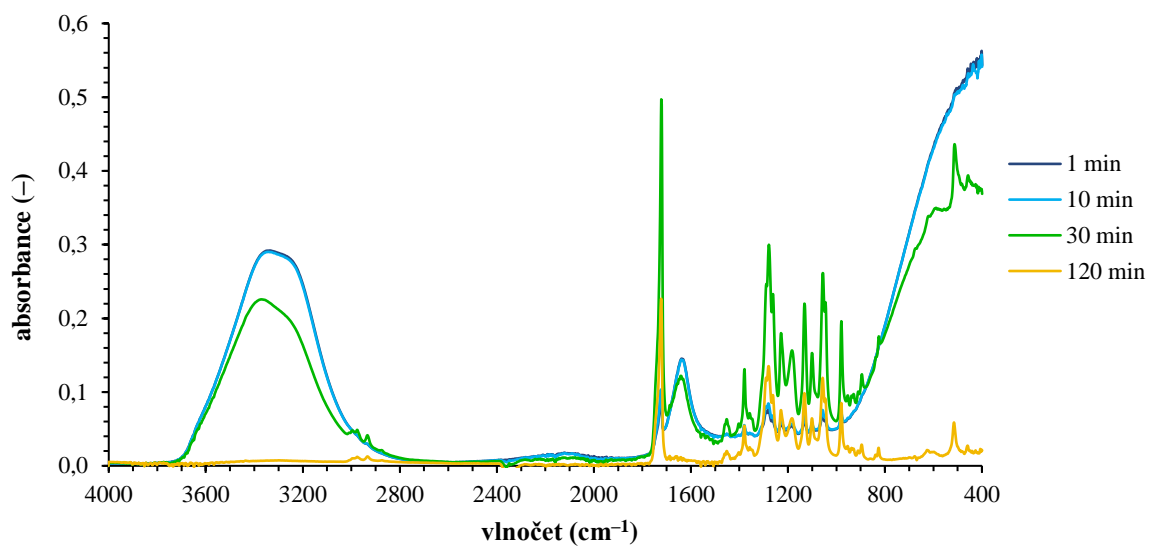
Příloha č. 13: Srovnání infračervených spekter v uvedených časech analýzy nativních PHB granulí izolovaných pomocí lysozymu, deoxyribonukleázy a mechanického rozrušení buněk ultrazvukem



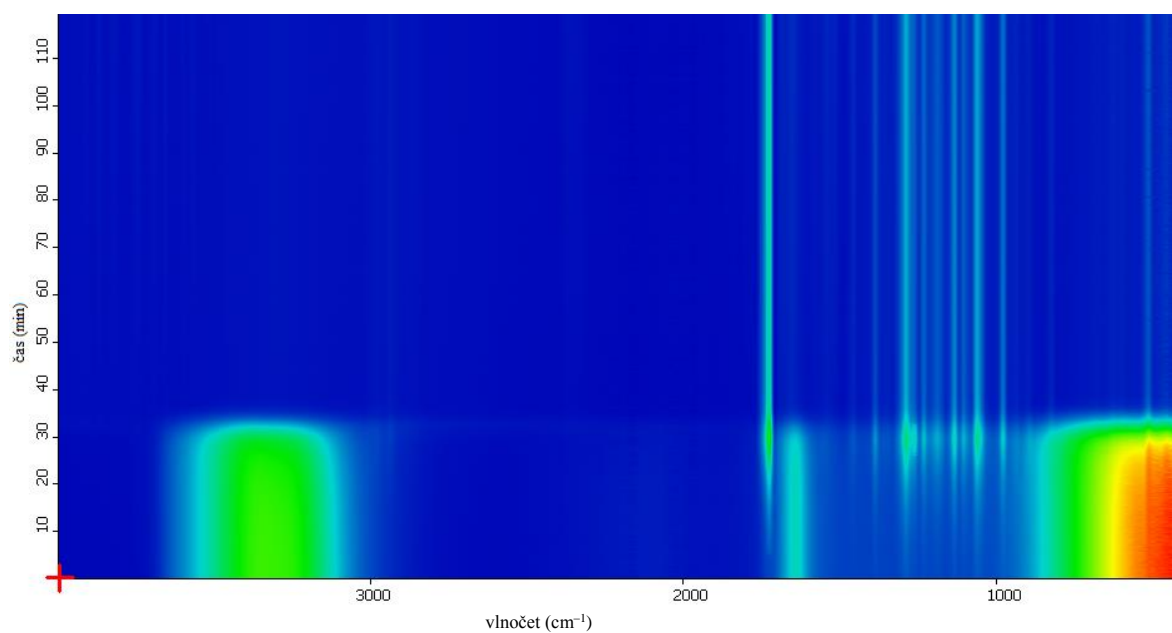
Příloha č. 14: Srovnání infračervených spekter v uvedených časech analýzy nativních PHB granulí izolovaných pomocí alkalázy a SDS



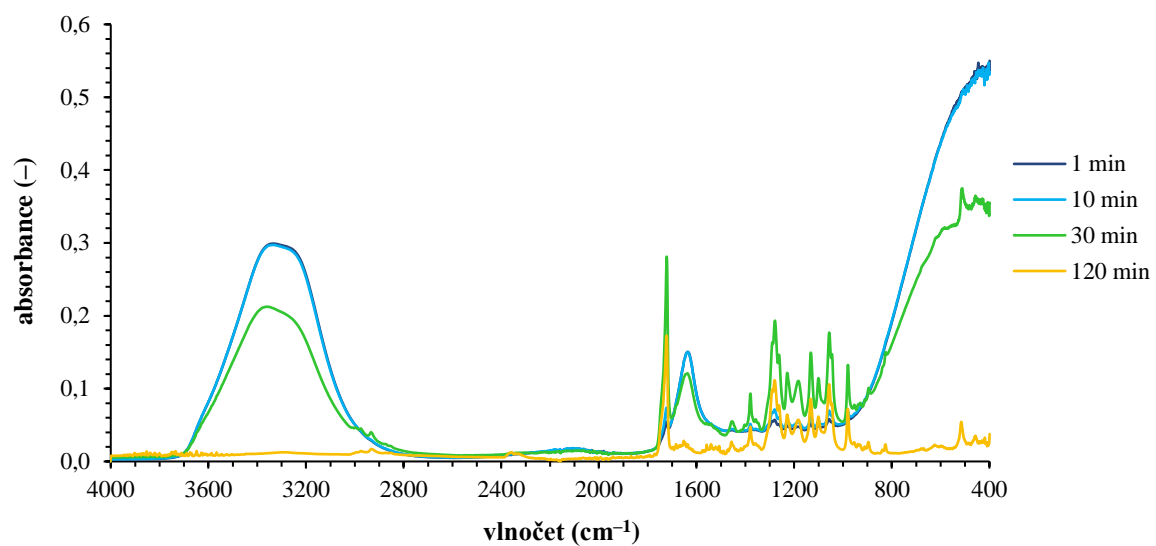
Příloha č. 15: Srovnání infračervených spekter zaznamenaných v uvedených časech analýzy nativních PHB granulí upravených chlornanem sodným



Příloha č. 16: Srovnání infračervených spekter zaznamenaných v uvedených časech analýzy nativních PHB granulí upravených lipázou



Příloha č. 17: Znázornění změn infračervených spekter v průběhu analýzy nativních PHB granulí upravených acetonem



Příloha č. 18: Srovnání infračervených spekter zaznamenaných v uvedených časech analýzy nativních PHB granulí upravených acetonem